



TESIS DOCTORAL

Efectos de los campos magnéticos estáticos sobre corteza parietal

María del Carmen Carrasco López

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

Director de tesis: Dr. Antonio Oliviero

Tutora: Dra. Rocío Leal Campanario

Sevilla, 2016

Agradecimientos

Toda esta historia de hacer una tesis doctoral comenzó gracias a Juan de los Reyes sin el que nada de esto hubiera sido posible ya que fue mi primer contacto con la ciencia y la persona que me animó a escribir al que sería mi futuro director de tesis.

En segundo lugar, quisiera agradecer a Antonio Olivero el darme la oportunidad de poder aprender y trabajar con él casi 5 años. Muchas gracias, Antonio, por haber confiado en mí a pesar de que no tenía ningún tipo de experiencia en investigación y ya hacía mucho que había dejado los libros atrás.

Durante mi estancia en el grupo FENNSI me he cruzado con muchas personas que me han ayudado de una manera directa o indirecta a realizar esta tesis. A todos ellos gracias. Muchas gracias, Guglielmo, por la ayuda en el análisis de datos. Sin duda ha habido una persona que además de haber sido una magnífica compañera, se ha convertido en amiga. Ella ha sido un pilar fundamental durante este duro proceso. Muchas gracias, Vanesa. Sin ti no hubiese sido posible

Por supuesto, no podré olvidar a todos los compañeros del hospital. Muchas gracias a todos por esas comidas en el chiringuito, por esos cafés, por esas cervezas después de los SIUNES o aquellas sin ninguna excusa y, por supuesto, muchas gracias por haber sido sujetos de mis experimentos. Muchas, muchas gracias, esta tesis es un poco de todos.

Las fuerzas también me han llegado desde la distancia y mi familia y mis amigos siempre se han preocupado por mí y, aunque no compartiésemos el día a día, nunca me he sentido sola. Gracias por haberme apoyado durante estos años y no dejar que deseperase. Gracias a ti, Diego, porque me has acompañado desde el principio de este camino y has sido mi luz durante los periodos más oscuros.

Por último y no menos importante, gracias a mi padre por apoyarme incondicionalmente, mostrarme su cariño y su comprensión tanto en los momentos dulces como en los más amargos.

"Debería ser prohibido haber vivido y no haber amado"
Andrés Calamaro

A mi padre por todo su apoyo y amor

Dedico esta tesis a la memoria de mi madre.

Índice

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
GLOSARIO.....	11
INTRODUCCIÓN.....	15
1. Anatomía del Sistema nervioso (SN).....	17
1.1. Organización del SNC.....	17
1.2. Lóbulo parietal	19
1.3. Vías ascendentes	22
1.3.1. Vías sensitivas somáticas conscientes	22
1.3.2. Vías sensitivas cerebelosas	23
1.3.3. Otras vías ascendentes	24
1.4. Tipos de fibras aferentes	24
1.5. Valoración del sistema somatosensorial.....	25
2. Electroencefalograma (EEG).....	28
2.1. EEG normal en vigilia.....	31
2.1.1. Ritmo Delta (δ).....	32
2.1.2. Ritmo Theta (Θ).....	32
2.1.3. Ritmo Alfa (α)	32
2.1.4. Ritmo Beta (β)	32
2.1.5. Ritmo Gamma (γ)	33
2.2. Electrodo y montajes	33
2.3. Técnicas de análisis.....	35
2.3.1. Análisis de frecuencia.....	35
2.3.2. Potenciales evocados (EP).....	36
2.3.2.1. Potenciales evocados somatosensoriales (SEPs)	37
3. Estimulación cortical	39
3.1. Antecedentes	39
3.2. Técnicas de neuromodulación no invasivas	41
3.2.1. Estimulación Magnética Transcraneal (TMS).....	42
3.2.2.1. Paradigmas de estimulación.....	43
3.2.2.1.1. Estimulación magnética transcraneal repetitiva (rTMS).....	44
3.2.2.1.2. Estimulación transcraneal Theta Burst (TBS).....	44
3.2.2.1.3. Estimulación transcraneal cuádrípulso (QPS).....	45
3.2.2.1.4. Estimulación pareada asociativa (PAS)	45
3.2.2. Estimulación transcraneal por corriente directa (tDCS)	45
4. Magnetismo	48
4.1. Introducción	48
4.2. Características de los campos magnéticos. Definiciones, ecuaciones y sistemas de unidades magnéticas	49
4.3. Antecedentes en experimentación animal y humana.....	51
4.4. Imanes de tierras raras y sus unidades.....	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55

MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
5.1. Características generales	61
5.2. Experimento 1: Estudio de seguridad de la aplicación transcraneal de campos magnéticos estáticos (tSMS) en corteza cerebral en humanos.....	62
5.2.1. Sujetos	62
5.2.2. Experimental set-up	62
5.2.3. Análisis datos.....	65
5.2.3.1. Muestras de sangre.....	65
5.2.3.2. Tests cognitivos	65
5.2.3.3. Tareas motoras	65
5.3. Experimento 2: Estudio neurofisiológico de la influencia de un campo magnético estático sobre corteza sensorial primaria (S1) izquierda.....	66
5.3.1. Sujetos	66
5.3.2. Diseño experimental	66
5.3.3. Análisis de datos	67
5.3.3.1. Análisis de frecuencia	68
5.3.3.2. Potenciales somatosensoriales (SEPs)	68
5.3.3.3. Oscilaciones de alta frecuencia (HFO)	69
5.3.3.4. Potenciales ERB y MEP	70
5.4. Exp. 3: Estudio de la influencia de un campo magnético estático sobre corteza sensorial primaria izquierda (S1) ante un estímulo eléctrico en el dedo índice derecho.	71
5.4.1. Sujetos	71
5.4.2. Diseño experimental	71
5.4.3. Análisis de datos	73
5.4.3.1. Análisis de Probabilidad de Respuesta (PR).....	73
5.4.3.2. Análisis de Tiempo de Reacción (RT).....	74
RESULTADOS.....	75
6.1. Experimento 1: Estudio de seguridad de la aplicación transcraneal de campos magnéticos estáticos sobre la corteza cerebral humana.	77
6.1.1. Valoración bioquímica de indicadores de daño celular	77
6.1.2. Tests cognitivos	78
6.1.3. Tiempo de Reacción (RT)	79
6.2. Experimento 2: Estudio neurofisiológico de la influencia de un campo magnético estático sobre la corteza sensorial primaria izquierda.....	81
6.2.1. Frecuencia.....	81
6.2.2. Potenciales evocados somatosensoriales (SEPs)	83
6.2.3. Oscilaciones de alta frecuencia (HFO)	84
6.2.4. ERB y MEP	85
6.3. Experimento 3: Estudio de la influencia de un campo magnético estático sobre la corteza sensorial primaria izquierda ante un estímulo eléctrico en el dedo índice derecho.	87
6.3.1. Probabilidad de Respuesta (PR)	87
6.3.2. Tiempo de reacción (RT).....	88
DISCUSIÓN	89
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105

ANEXO.....	119
Exp. 4: Estudio control	121
Sujetos	121
Diseño experimental	121
Análisis de datos	123
Resultados.....	123

Índice de figuras y tablas

Fig. 1 Representación del neocortex.....	19
Fig. 2 Representación de las áreas de corteza que corresponden con S1.....	20
Fig. 3 El homúnculo sensitivo (derecha) y motor (izquierda).....	21
Tabla 1 Clasificación de las fibras sensoriales en los nervios periféricos.....	25
Tabla 2 Clasificación de los receptores sensoriales de acuerdo con la función sensorial, el tipo de estímulo y de receptor celular	26
Fig. 4 Métodos de valoración sensitiva.....	27
Tabla 3 Descripción del significado de cada símbolo y su unidad de medida en el SI.....	30
Fig. 5 Representación de la distribución de electrodos para el registro de EEG según el SI 10/20.	34
Fig. 6 Pintura que muestra como Aldini aplicaba electricidad a los cuerpos decapitados.....	40
Fig. 7 Representación de los dos tipos de bobinas más utilizadas.....	42
Fig. 8 Protocolos correspondientes con la estimulación <i>theta burst</i>	44
Fig. 9 Comparación del efecto de la estimulación anódica y catódica.....	46
Fig. 10 Representación de las líneas de campo de un imán y su distribución.	50
Tabla 4 Características de los imanes y los cilindros de acero.	53
Fig. 11 Diferentes imanes y placebo y la relación entre fuerzas (mT) y distancia (cm).	54
Fig. 12 Representación de la colocación del tSMS en la corteza visual.....	63
Fig. 13 Diseño del protocolo experimental del Experimento 1	63
Fig. 14 Diseño experimental del Exp. 2.....	67
Fig. 15 Ejemplo representativo del procesamiento de la señal de EEG para la obtención de las HFO en un sujeto	69
Fig. 16 Ejemplo de la sincronización de HFO en un sujeto representativo	70
Fig. 17 Diseño del protocolo experimental del Exp. 3.....	72
Fig. 18 Representación de la colocación del sujeto, la tSMS y a estimulación eléctrica en el Exp.3.	72

Fig. 19 Representación del total de "Sí" y "Silencio" a lo largo de un bloque experimental.....	73
Fig. 20 Criterio de exclusión en el análisis final en el Exp.3.....	74
Fig. 21 Curso temporal de la concentración de NSE.....	77
Fig. 22 Curso temporal de la concentración S100 β	78
Fig. 23 Curso temporal la fluidez verbal.....	79
Fig. 24 Curso temporal de la tarea visual-motora de ambas manos.....	80
Fig. 25 Curso del tiempo en realizar la tarea NHPT.....	80
Fig. 26 Curso temporal de la frecuencia α durante los periodos de estimulación eléctrica.....	81
Fig. 27 Densidad espectral de frecuencia α	82
Fig. 28 Representación temporal de la frecuencia α durante los periodos de pausa.	82
Fig. 29 Representación de la banda β a lo largo del tiempo.	83
Fig. 30 Promedio general de los SEPs en el canal C3'C4'.	83
Fig.31 Representación temporal de las componentes N20, P25 y N30.....	84
Fig. 32 Promedio general de HFO grupo real/placebo respecto a su correspondiente línea de base.	85
Fig. 33 Potencial MEP.....	86
Fig. 34 Representación de la probabilidad de respuesta (un punto por bloque; 10 min por bloque) del Exp. 3.	87
Fig. 35 Curso temporal de la PR cada 5 min.....	88
Fig. 36 Curso temporal del tiempo de reacción ante la detección del estímulo.....	88
Fig. 34 Diseño experimental del Exp. 4.1.....	122
Fig. 35 Diseño experimental del Exp. 4.2.....	122
Fig. 36 Resultados del Exp. 4.1	123
Fig. 37 Resultados del Exp. 4.2	124

Glosario

CI	Intervalo de confianza
cTBS.	Estimulación continua <i>theta-burst</i>
DC	Estimulación directa
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EP	Potencial evocado
FFT	Transformada rápida de Fourier
fMRI	Resonancia magnética funcional
G	Gauss
HFO	Oscilaciones de alta frecuencia
IAF	Frecuencia alfa individual
imTBS	Estimulación <i>theta-burst</i> intermedia
iTBS	Estimulación <i>theta-burst</i> intermitente
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
M1	Corteza motora primaria
ME	Médula espinal
MEP	Potencial evocado motor
MMSE	<i>Mini-mental Status Examination</i>
NHPT	<i>Nine hole peg test</i>
NIBS	Estimulación cerebral no invasiva
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSE	Enolasa específica neuronal
PAS	Estimulación asociada pareada
PR	Probabilidad de respuesta

PSD	Densidad espectral de potencia
QPS	Estimulación transcraneal cuadripulso
RMT	Umbral motor en reposo
RT	Tiempo de reacción
rTMS	Estimulación transcraneal repetitiva
S1	Corteza somatosensorial primaria
S2	Corteza somatosensorial secundaria
SAP	Potencial de acción sensorial
SD	Desviación estándar
SEP	Potencial evocado somatosensorial
SI	Sistema internacional
SMS	Estimulación campos magnéticos
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T	Tesla
tACS	Estimulación transcraneal con corriente alterna
TBS	Estimulación <i>theta-burst</i>
tDCS	Estimulación transcraneal con corriente directa
TES	Estimulación eléctrica transcraneal
TMS	Estimulación magnética transcraneal
tRCS	Estimulación transcraneal con corriente randomizada
tSMS	Estimulación transcraneal con campos magnéticos estáticos

Introducción

1. Anatomía del Sistema nervioso (SN)

La unidad básica del sistema nervioso (SN) es la neurona, cuya organización y diferenciación son la base para crear un sistema complejo con funciones diversas y específicas. El SN se divide en dos. Por un lado se encuentra el sistema nervioso central (SNC), el cual se subdivide a su vez en encéfalo y médula espinal (ME), ambos recubiertos por las meninges y flotando en el líquido cefalorraquídeo. Por otro lado, aquellas neuronas y nervios que no pertenecen al SNC corresponden al sistema nervioso periférico (SNP). Durante el desarrollo de este capítulo nos centraremos con más atención en el SNC y, más concretamente en el lóbulo parietal y las vías ascendentes, ya que este lóbulo es el objetivo de estudio reportado en esta tesis.

1.1. Organización del SNC

En la parte más caudal del SNC se encuentra la ME conectada con el SNP mediante los nervios raquídeos, los cuales salen de la ME a través de los agujeros intervertebrales. La ME tiene forma de tubo y se encuentra alojada dentro de la columna vertebral. En el adulto se pueden distinguir dos zonas: una primera en forma de mariposa a nivel central de la médula, que corresponde a la sustancia gris (soma de las neuronas), la cual se subdivide en las astas anteriores/ventrales (motoras) y las astas posteriores/dorsales (sensitivas). La segunda zona corresponde con la sustancia blanca (axones mielinizados), que se encuentra alrededor de la sustancia gris.

La siguiente estructura que encontramos a la zona rostral de la médula espinal es el tronco del encéfalo, el cual consta de tres partes diferenciadas: bulbo raquídeo, protuberancia y mesencéfalo. El bulbo raquídeo se localiza a la altura del agujero magno conectando la protuberancia y la médula espinal, e incluye los centros responsables de funciones autonómicas vitales como la respiración, digestión o frecuencia cardíaca además de los núcleos correspondientes con los pares craneales. En cuanto al origen embriológico de la protuberancia y cerebelo, ambos provienen del mismo segmento del tubo neuronal aunque posteriormente en el desarrollo se diferenciarán. El cerebelo, por su parte, se ubica de manera dorsal al tronco del encéfalo conectándose al tronco cerebeloso gracias a los pedúnculos cerebelosos. La función del cerebelo está relacionada con la interacción de la ejecución motora a través de sus conexiones con tálamo y cortezas motoras. Por las vías aferentes recibe información del estado del sistema creándose así in bucle de información. El diencéfalo, que se presenta de manera rostral al tronco del encéfalo, contiene dos estructuras diferenciadas: el tálamo y el hipotálamo. El primero procesa la mayoría de la información que alcanza los hemisferios cerebrales desde el resto del SNC y el segundo regula funciones autonómicas, endocrinas y viscerales. El cerebro consta de dos hemisferios separados

por la fisura longitudinal cerebral y cada uno de los cuales se encuentra dividido, a su vez, en cuatro lóbulos: lóbulo temporal, lóbulo parietal, lóbulo frontal y lóbulo occipital. Esta división se basa en la disposición de los principales surcos que se encuentran dispuestos sobre la corteza: la cisura de Rolando, la cisura de Silvio, el surco parieto-occipital surco colateral y la incisura pre-occipital. Algunos autores también contabilizan como lóbulos independientes la región el lóbulo límbico y el lóbulo de la ínsula (el único interior). De modo profundo en los hemisferios cerebrales se distinguen tres estructuras profundas: los ganglios basales, el hipocampo y los núcleos de la amígdala.

La corteza cerebral se caracteriza por tener seis capas o láminas numeradas, desde la uno (capa más externa) a la seis (la más profunda, adyacente a la sustancia blanca). Hay que destacar que, a pesar de que las seis capas son estructuras constantes en toda la corteza cerebral, existen variaciones en la densidad del número y tipo de células en las diferentes regiones cerebrales (Jones, 1983). Así, el grosor puede variar entre 4.5 mm en área motora hasta de 1.5 mm en el área visual (**Fig. 1**).

Las neuronas que constituyen el neocortex presentan una gran variedad de formas y tamaños. Las interneuronas locales representan el 20-25% de la población neuronal del neocortex y se encuentran distribuidas homogéneamente por todas las capas. En su mayoría son inhibitorias y el principal neurotransmisor involucrado en su función es el ácido γ -aminobutírico (GABA). No obstante, también existen una minoría de interneuronas excitatorias cuyo neurotransmisor es el glutamato. Estas interneuronas son las principales receptoras de la información sensorial procedente del tálamo (Kandel et al, 2000).

El neocortex está organizado en columnas verticales, cada una de las cuales tiene un ancho de 300-600 μm y está dividida en las siguientes capas:

- Capa I o capa molecular. Se caracteriza por tener una densidad celular muy baja. Es la más externa o superficial. Su principal contenido son las dendritas procedentes de las células piramidales de las capas IV y V para poder realizar conexiones con otras áreas cerebrales.
- Capa II o capa granular externa. Presenta una densidad muy elevada de células piramidales pequeñas, células estrelladas y células de araña.
- Capa III o capa piramidal externa. Esta capa a su vez se puede subdividir en dos subláminas. La capa IIIa superficial presenta células piramidales pequeñas mientras que la capa IIIb profunda está poblada por células piramidales grandes.
- Capa IV o capa granular interna. Es el principal receptor de los *inputs* sensoriales del tálamo y la más prominente de las áreas sensoriales primarias. Como su nombre indica, esta capa se caracteriza por presentar una elevada densidad de células granulares, neuronas pequeñas de Golgi de tipo II. Esta capa permite dividir la corteza en capas supragranulares e infragranulares.

- Capa V. Capa piramidal interna o también llamada capa ganglionar. Consta de células piramidales de tamaño medio y grande.
- Capa VI o capa multiforme. Está poblada por neuronas heterogéneas en su morfología, células fusiformes, granulares y piramidales.

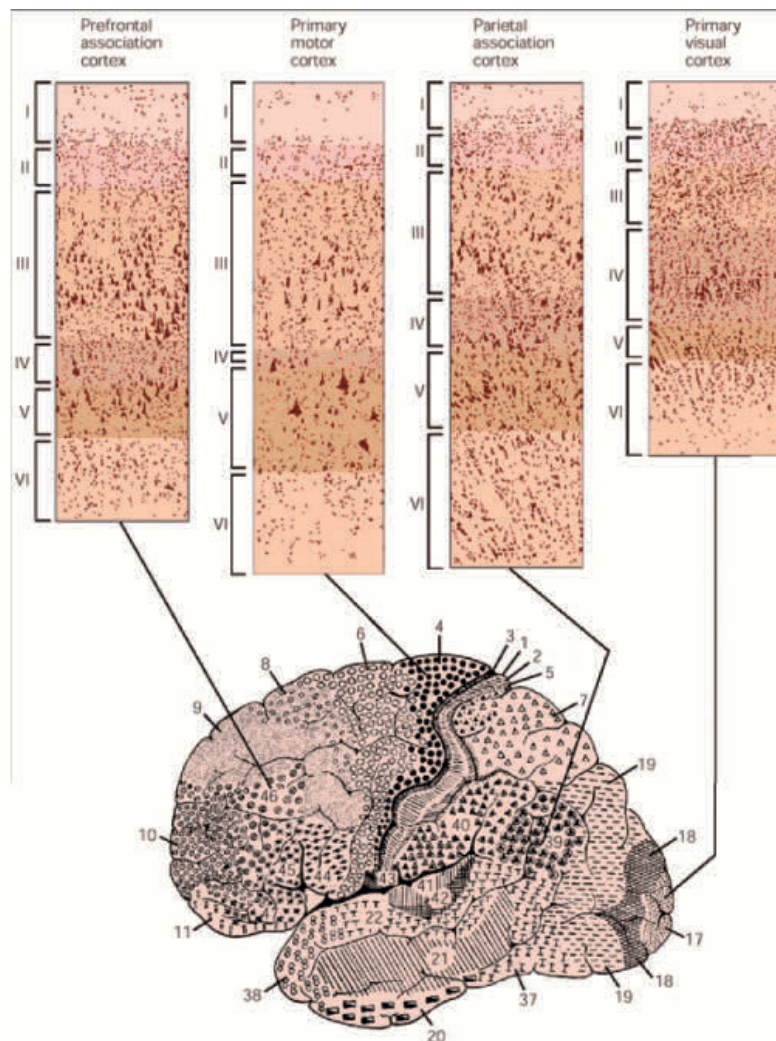


Fig. 1 Representación del neocórtex.

Se puede observar la división anatómica de los diferentes lóbulos cerebrales y la densidad de las capas del neocórtex. Figura adaptada del libro "Principios de neurociencias" (Kandel et al, 2000)

1.2. Lóbulo parietal

El lóbulo parietal recibe este nombre por su localización justo bajo el hueso llamado con el mismo nombre, el hueso parietal. Este lóbulo se encuentra en la intersección entre las cortezas visual, auditiva y motora. Por esta razón, el pionero del estudio del lóbulo parietal, el neurólogo McDonald Critchley, la definió como "*el cruce de caminos del cerebro*" (Critchley, 1953). Más concretamente, los límites del lóbulo parietal están determinados por las siguientes referencias anatómicas: a) a nivel anterior, por la cisura de Rolando; b) a nivel ventral, por la cisura de Silvio; c) a nivel dorsal, por el giro

cingular; y d) a nivel posterior, por la cisura parieto-occipital (Kandel *et al.*, 2000). La función principal de este lóbulo cerebral es la interpretación de la información sensorial, así como la asociación e integración del esquema corporal y los movimientos, a excepción de la información sensorial olfativa.

El lóbulo parietal se puede subdividir en dos partes: la zona anterior y la zona posterior.

- La zona anterior, llamada corteza somatosensorial primaria (S1), histológicamente comprende las áreas 1, 2, 3a y 3b de Brodmann (**Fig. 2**). Las principales conexiones aferentes corresponden con los axones procedentes del tálamo, que en su mayoría conectan con las áreas 2a y 3b, aunque algunas también proyectan a las áreas 1 y 2. La información de S1 converge hacia las neuronas de la corteza parietal posterior y corteza somatosensorial primaria. Existe un procesamiento jerárquico de la información somatosensorial en S1, siendo el área 3b donde se realiza el primer procesamiento de la percepción somática para posteriormente distribuirla a otras áreas. Así, en el área 1 tiene lugar la más compleja procesamiento mientras que en el área 2 se procesa la información táctil junto con la información sobre la posición de los miembros.
- Corteza somatosensorial secundaria (S2). La información proviene de la corteza S1 ipsilateral y de algunos núcleos del tálamo (núcleo ventral postero-inferior y núcleo triangular ventral). Su localización topográfica se encuentra en la cara interna del borde superior del suco lateral a nivel interno. S2 juega un papel en el reconocimiento de objetos, formas, texturas y frecuencia de vibración.
- La zona posterior o corteza parietal posterior corresponde con las siguientes áreas de Brodmann: 5, 7, 39 y 40. En primer lugar, la función de la corteza parietal posterior es la integración de la información aportada por las vías aferentes sensitivas (regiones somáticas y visuales) y, en segundo lugar, el control del movimiento.

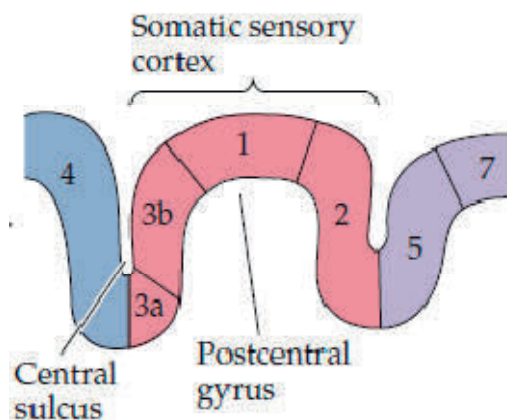


Fig. 2 Representación de las áreas de corteza que corresponden con S1.
Figura adaptada del libro "Principios de neurociencias" (Kandel *et al.*, 2000)

El patrón de las conexiones dentro de la corteza somatosensorial se encuentra orientado verticalmente de forma perpendicular a la superficie cortical. De este modo, las neuronas de cada capa proyectan a dianas específicas de diversos modos. Existen conexiones horizontales dentro de las capas II y III que relacionan columnas vecinas permitiendo compartir información cuando se activan simultáneamente por el mismo estímulo. Además, dichas neuronas proyectan a otras regiones corticales en el hemisferio ipsilateral o contralateral. Los axones tálamo-corticales se conectan en racimo con las neuronas de capa IV cuyos axones proyectan verticalmente hacia la superficie de la corteza. Por otro lado, las neuronas de capa V reciben información de capa II y III de la misma columna además de la adyacente, para posteriormente proyectar a estructuras subcorticales como, por ejemplo, los ganglios basales y los núcleos del tronco del encéfalo. Por último, la capa VI proyecta al tálamo (Kandel et al, 2000).

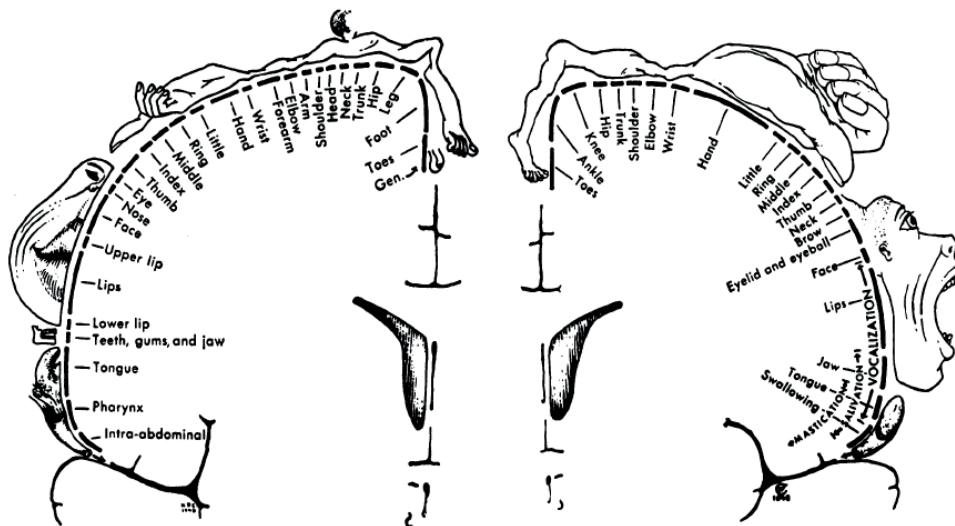


Fig. 3 El homúnculo sensitivo (derecha) y motor (izquierda).
Dibujo diseñado por Penfield y Rasmussen (Penfield & Rasmussen, 1950).

Hay que destacar que la corteza S1 y S2 tiene una representación somatotópica ordenada de todos los segmentos corporales, desde los pies hasta la cabeza creando un mapa, denominado homúnculo. El concepto de homúnculo (del latín *homunculus*; **Fig. 3**) fue descrito por primera vez por el neurocirujano canadiense Wilder Penfield (Penfield & Boldrey, 1937), quien estudió la organización somatotópica de la corteza motora y sensorial. Los homúnculos de S1 y la corteza motora primaria (M1) están separados anatómicamente por la cisura de Rolando. Por un lado, los miembros inferiores se encuentran representados en las zonas más mediales del cerebro y, por el otro, los miembros superiores y la cara, en las zonas más laterales. De este modo, se

puede localizar fácilmente cualquier segmento corporal en una persona sana, siempre teniendo en cuenta que es una representación estándar de la población.

1.3. Vías ascendentes

Las vías ascendentes recorren la sustancia blanca de la médula espinal hacia el cerebro y cerebelo. Su función es conectar los receptores periféricos con los diferentes segmentos medulares o con los centros superiores. A nivel general podemos describir las vías ascendentes como una vía trisináptica, donde el receptor periférico contacta con la dendrita de la neurona de primer orden. A continuación, el axón de dicha neurona de primer orden hace sinápsis con la neurona de segundo orden en el asta posterior de la médula espinal. La neurona de segundo orden se decusa a distintos niveles de la médula espinal (según la vía) hasta sinaptar con su neurona homóloga en el tálamo. Es aquí donde se produce la tercera sinápsis con la neurona de tercer orden que proyecta hacia la corteza somatosensorial. Las modalidades sensoriales relacionadas con estas vías son los sentidos somáticos y viscerales. Sin embargo, la información de los sentidos de olfacción, gusto, visión, audición y equilibrio se transmite por otras vías hacia la corteza, donde posteriormente será integrada junto con el resto de la información sensorial excepto la olfacción. La transmisión de la información periférica se produce gracias al proceso de transducción sensorial, donde los diferentes tipos de estímulos (mecánicos, térmicos...) se convierten en una señal eléctrica (potencial de acción). Dicha transducción sensorial es un proceso muy sofisticado que se transmite a través de unas vías de información altamente especializadas, es decir, para cada tipo de *input* hay un receptor específico que sinapta con una fibra cuya posición anatómica y fisiológica (morfología, velocidad de conducción...) es específica. Los estímulos pueden provenir de diferentes fuentes, por tanto, se pueden clasificar en tres tipos diferentes de información sensorial:

- Información propioceptiva. Encargada de la posición consciente de la postura, transmite la información desde articulaciones, músculos y tendones.
- Información exteroceptiva. En la interacción del cuerpo con el exterior, transmite información referente al tacto, presión, temperatura, vibración y dolor. Sus receptores se encuentran a nivel externo, en la piel.
- Información interoceptiva. Regula las señales internas, como el pH o la presión arterial, que no suelen llegar a ser conscientes, y su papel es esencial para regular las funciones autónomas.

1.3.1. Vías sensitivas somáticas conscientes

Son las vías encargadas de transmitir los estímulos que llegan a ser conscientes como, por ejemplo, el dolor y la temperatura. Tienen en común que la neurona de tercer orden

se encuentra en el núcleo ventral postero lateral ipsilateral del tálamo y que, además, conectan con S1.

- Vía espino-talámica-lateral. Recibe la entrada periférica desde las terminaciones nerviosas libres. La neurona de segundo orden se decusa en sentido oblicuo hacia el lado opuesto dentro de la médula espinal para, posteriormente, ascender por el cordón blanco contralateral. A medida que esta vía asciende a través del bulbo raquídeo, se incorpora a ella el tracto espinotalámico anterior y espinotectal. Esta vía es la encargada de transmitir la información de dolor y temperatura.
- Vía espino-talámica anterior. Los receptores relacionados con esta vía son las terminaciones nerviosas libres, los discos de Merkel, las terminaciones peritriquiales y los corpúsculos de Pacini, los cuales procesan la información de tacto ligero y presión. Los axones de las neuronas de segundo orden cruzan de manera aún más oblicua que los de la vía espinotalámica lateral dentro de la médula espinal, para ascender por el cordón blanco anterior.
- Fascículo grácil (de Goll) y fascículo-cuneato (de Budach). Son los encargados de transmitir información del tacto discriminativo, sensibilidad vibratoria y sensibilidad muscular consciente. Los corpúsculos de Meissner, de Pacini, los husos neuromusculares y los órganos tendinosos son los receptores que sinaptan con las neuronas de primer orden de estas vías. Las neuronas de primer orden ascienden por el lado homolateral a través del cordón blanco posterior, donde hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden que se encuentran en los núcleos grácil y cuneiforme del bulbo raquídeo, las cuales se decusan llegando a tálamo.

1.3.2. Vías sensitivas cerebelosas

Estas vías conectan los receptores periféricos con el cerebelo. La información que transmiten está relacionada con la sensibilidad articular muscular inconsciente. Dicha información proviene de los husos neuromusculares, los órganos tendinosos, los receptores articulares del tronco y los miembros. No existen neuronas de tercer orden en estas vías.

- Vía espino-cerebeloso posterior. Las neuronas de segundo orden acceden al cerebelo a través del pedúnculo cerebelar inferior tras hacer sinapsis de manera ipsilateral con las neuronas de primer orden. Su recorrido se corresponde con el cordón blanco posterolateral de la médula espinal.
- Vía espino-cerebeloso anterior. Se produce una decusación de las neuronas de segundo orden. Tras cruzar al lado opuesto, asciende por el cordón blanco lateral

de la médula espinal. Sus fibras terminan en la corteza cerebelosa penetrando a través del pedúnculo cerebeloso superior.

- Vía cuneo-cerebelosa. Esta vía integra la información del haz grácil y cuneiforme hacia la corteza cerebelosa. Se localiza en el cordón posterior en la médula espinal.

1.3.3. Otras vías ascendentes

- Vía espino-reticular. Sus fibras ascienden por el cordón blanco lateral mezcladas con el tracto espinotalámico lateral. La mayoría de sus fibras no se decusan y sinaptan con las neuronas de la formación reticular del tronco encefálico. Esta vía se relaciona con la influencia que la percepción ejerce sobre los niveles de consciencia.
- Vía espino-tectal. Asciende por el cordón blanco anterolateral de manera contralateral, sinaptando con las neuronas del colículo superior. Transmite información relacionada con los reflejos espinovisuales.
- Vía espino-olivar. Transmite impulsos cutáneos y propioceptivos hasta el cerebelo.
- Fascículos sensitivos viscerales. Encargados de transmitir el dolor y estiramiento de las vísceras.
- Vía espino-cervicotalámico (de Morin). Asciende por el cordón lateral blanco y conduce la información propioceptiva consciente.

1.4. Tipos de fibras aferentes

En el SNP las fibras nerviosas aferentes (sensoriales) y eferentes (motoras) se agrupan en los nervios periféricos. Las fibras aferentes conectan los receptores periféricos con el asta posterior de la médula espinal. Los nervios periféricos se pueden clasificar en función de las propiedades del axón como la velocidad de conducción del impulso nervioso, el diámetro y el grado de mielinización. La relación existente entre el diámetro de las fibras mielinizadas y la velocidad de conducción se basa en la menor resistencia interna de las fibras con mayor densidad de mielina. Por tanto, a mayor diámetro, mayor velocidad. Esta diferencia de velocidad de transmisión permite al cerebro poder distinguir las señales nocivas del resto de los *inputs* recibidos (**Tabla 1**).

Clasificación fisiológica	electro-	Clasificación de las fibras aferentes	Díámetro de las fibras (μm)	Velocidad de conducción (m/s)
Fibra sensitiva				
Aα		Ia y Ib	13-20	80-120
Aβ		II	6-12	35-75
Aδ		III	1-5	5-30
C		IV	0.2-1.5	0.5-2
Fibra motora				
Aα		--	12-20	72-120
Aγ		--	2-8	12-48
B		--	1-3	6-12
C		--	0.2	0.5-2

Tabla 1 Clasificación de las fibras sensoriales en los nervios periféricos (Duane & Haines, 2004)

1.5. Valoración del sistema somatosensorial

Los humanos presentan un sistema somatosensorial complejo y altamente especializado (**Tabla 2**). Cada sistema sensorial precisa de receptores específicos capaces de transducir los diferentes tipos de estímulos recibidos (luz, presión, dolor...) en un potencial de acción que llegará a estructuras superiores para que pueda ser interpretado por el cerebro. Esta especificidad viene determinada, en primer lugar, por la existencia de receptores específicos para cada tipo de estímulo y, en segundo lugar, por variables físicas propias de cada receptor como, por ejemplo, la cantidad de receptores involucrados, la intensidad o la duración del estímulo necesario para activar un receptor sensorial. De este modo, es necesaria la existencia de diferentes tests de valoración para las características de las distintas modalidades sensoriales.

Si nos concentramos en el sistema sensorial somatosensorial, que es en el que se centra esta tesis doctoral, se observa que se encuentra dividido en cinco submodalidades: tacto, dolor, prurito, propiocepción y visceral (no dolor). Destaca que el conjunto de estas cinco submodalidades engloba la sensibilidad tanto interna como externa del sistema relacionado con síntomas clínicos como la hipoestesia o la anestesia. La percepción es la actividad somatosensorial que llega a ser una sensación consciente. La intensidad mínima del estímulo necesaria para que una sensación se transforme en consciente define el llamado umbral sensorial (no hay que confundirlo con el concepto de umbral neurofisiológico, que es aquella intensidad mínima que produce un potencial de acción). Los umbrales, por convenio, se definen como la amplitud del estímulos detectados en la mitad de ensayos (Kandel et al, 2000). Una alteración en los rangos normales de

umbrales se puede relacionar con alteraciones en los receptores sensoriales, déficits en la propiedades conducción nerviosa o, incluso, con lesiones en áreas cerebrales de procesamiento (Kandel et al, 2000).

Sistema sensorial	Modalidad	Estímulo	Receptor	Receptor celular
Visual	Visión	Luz	Fotoreceptor	Bastones y conos
Auditivo	Audición	Sonido	Mecanoreceptor	Cilios de la cóclea
Vestibular	Equilibrio	Gravedad, aceleración	Mecanoreceptor	Cilios del laberinto vestibular
Somatosensorial				
	Tacto	Deformación y movimiento de la piel	Mecanoreceptor	Piel
	Propiocepción	Estiramiento, fuerza muscular y ángulo articular	Mecanoreceptor	Husos neuromusculares y receptores articulares
	Dolor	Estímulos nocivos (térmicos mecánicos y químicos)	Mecanoreceptor, termoreceptor y quimiorreceptor	Todos los tejidos menos el SNC
	Prurito	Histamina	Quimiorreceptor	Piel
	Visceral (no dolor)	Rango ancho (térmicos mecánicos y químicos)	Mecanoreceptor, termoreceptor y quimiorreceptor	Tracto gastro-intestinal pulmones y vejiga
Gustativo	Gusto	Químicos	Quimiorreceptor	Papilas gustativas
Olfatorio	Olfacción	Odorante	Quimiorreceptor	Neuronas olfativas

Tabla 2 Clasificación de los receptores sensoriales de acuerdo con la función sensorial, el tipo de estímulo y de receptor celular (Kandel et al, 2000).

Los métodos utilizados para la valoración umbral se pueden diferenciar en el método de los límites del umbral o el método de los niveles (**Fig. 4**). La presentación de los estímulos para estimar el umbral puede hacerse de diversas formas: mientras que en el método de niveles se incrementa o se disminuye progresivamente la intensidad del estímulo (rampa de ascenso o descenso) hasta que el individuo lo detecte, en el método de los límites se alterna la intensidad por encima y por debajo del umbral hasta ajustar ésta al valor umbral.

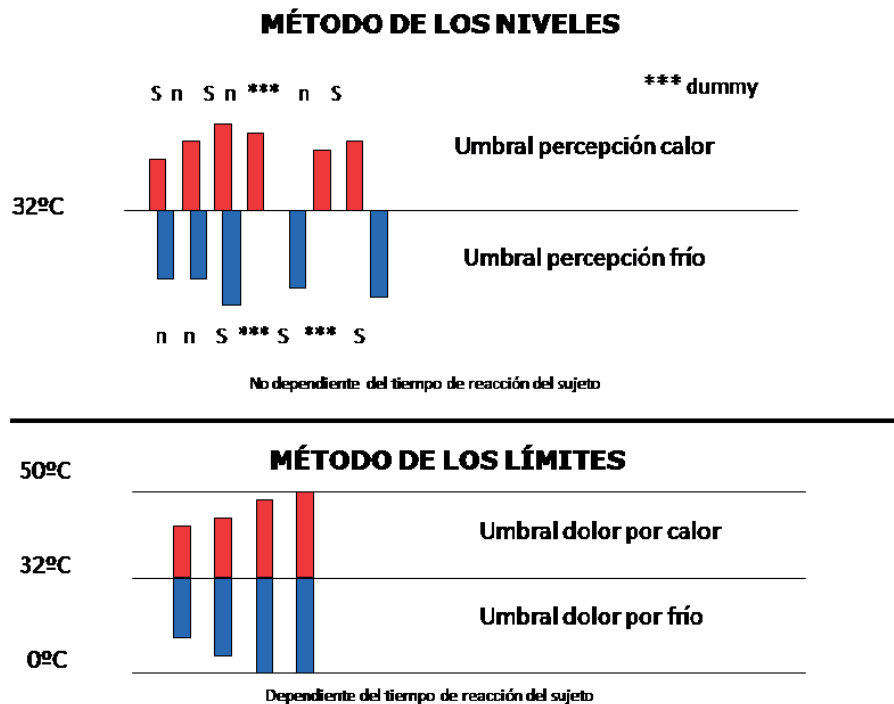


Fig. 4 Métodos de valoración sensitiva.

El umbral sensitivo se puede determinar mediante una rampa ascendente o descendente de intensidad de estímulo (métodos de los niveles) o mediante la presentación de estímulos supraumbral e infraumbral alternativamente hasta ajustar la intensidad al valor del umbral (método de los límites)

Cuando los estímulos se presentan de manera repetida de igual intensidad, se produce una adaptación de los receptores sensoriales, siendo específico el grado y el ritmo de adaptación de cada uno de ellos. No obstante, a nivel propioceptivo (es la modalidad sensorial que se centra esta tesis) existen dos procesos de adaptación:

1. **Habituaación:** disminución de la sensibilidad como resultado de una estimulación repetida, sin que se haya producido una fatiga motora o sensorial (Christoffersen, 1997; Groves & Thompson, 1970; Rankin et al, 2009). En el artículo publicado por Rankin *et al.*, se describen las nueve características de la habituación descritas por Thompson y Spencer en 1966 (Thompson & Spencer, 1966), además de añadir una décima. La habituación se distingue de la fatiga motora y sensorial por el proceso de la deshabituaación (Christoffersen, 1997; Groves & Thompson, 1970; Rankin et al, 2009).
2. **Sensibilización:** amplificación de la respuesta sensorial como resultado de la presentación repetida de un estímulo nocivo, fuerte o nuevo (Kandel et al, 2000; Peeke & Petrinovich, 1984).

2. Electroencefalograma (EEG)

El sistema somatosensorial se puede estudiar no sólo con exploraciones clínicas y funcionales sino también con técnicas de neurofisiológicas. Estas técnicas son capaces de convertir las señales biológicas en señales analógicas y así poder estudiar el sistema nervioso de forma objetiva, una de estas técnicas es el EEG.

El EEG se define como la actividad eléctrica cerebral registrada a través de la superficie del cuero cabelludo gracias a electrodos dispuestos sobre ella (Niedermeyer & da Silva, 2005). Esta técnica permite tener una alta resolución temporal y explorar las funciones corticales. Además, sirve como herramienta para comparar los estados corticales normales y patológicos de manera no invasiva e indolora.

La descripción de las ondas cerebrales fue realizada en primer lugar por el inglés Richard Caton en 1875 tras el registro de conejos y monos con el cerebro expuesto (Caton, 1875). Sin embargo, no fue hasta 1929 que el Doctor alemán Hans Berger registró la actividad cerebral en humano de una forma no invasiva tan solo con galvanómetro y un amplificador. Fue él mismo quien acuñó el término de encefalograma (Berger, 1929).

El EEG es el resultado de la suma temporal y espacial de los potenciales postsinápticos procedentes de las neuronas piramidales orientadas verticalmente en la corteza cerebral (Schaul, 1998). Esta actividad eléctrica está causada por el flujo de corrientes eléctricas intracelulares y la actividad sináptica entre ellas. Además, es extremadamente sensible a los efectos de las corrientes secundarias o corrientes extracelulares (Baillet et al, 2001). La composición de la corriente eléctrica cerebral consiste en su mayoría en iones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- que son bombeados (intra o extra celular) a través de los canales transmembrana de las neuronas en una dirección u otra según el potencial de membrana (Atwood & MacKay, 1989). Esta actividad celular está regida por leyes físicas como la ley de Ohm o/y Maxwell. En la **Tabla 3** se define el significado de cada símbolo de las siguientes fórmulas en el Sistema Internacional (SI).

La ley de Ohm establece que la diferencia de potencial es proporcional a la intensidad de la corriente y a la resistencia que ofrece el medio al movimiento de electrones.

$$V = RI$$

La ley de Maxwell conforma un conjunto de cuatro ecuaciones que describen los fenómenos electromagnéticos (Maxwell, 1863):

1. La ley de Gauss relaciona el flujo de campo eléctrico que atraviesa una superficie cerrada con la carga que está dentro de esta superficie. Además, determina que el flujo total a través de una superficie cerrada sólo depende de la carga interior.

$$\nabla \vec{D} = \rho$$

2. La ley de Gauss describe que para un campo electromagnético, el flujo a través de cualquier superficie cerrada es nulo ya que siempre poseen un polo norte y polo sur.

$$\nabla \vec{B} = 0$$

3. La ley de Faraday describe la interacción entre los campos magnéticos y eléctricos y la consecuente producción de fuerzas electromagnéticas, donde el voltaje inducido en un circuito eléctrico cerrado es directamente proporcional a la rapidez con el que cambia en el tiempo el flujo magnético.

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$$

4. La ley de Ampère Generalizada consiste en la ley de Ampère (la relación que se establece entre un campo magnético inmóvil y una corriente eléctrica que no varía en el tiempo) pero adaptada a campos no estacionarios, donde se mantiene el principio de conservación de la carga.

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$$

Símbolo	Significado	Unidad de medida SI
\vec{E}	Campo eléctrico	voltio por metro
\vec{H}	Campo magnético	amperio por metro
\vec{D}	Densidad de campo eléctrico	culombio por metro cuadrado
\vec{B}	Densidad de campo magnético	tesla
ρ	Densidad de carga eléctrica	culombio por metro cúbico
\vec{J}	Densidad de corriente	amperio por metro cuadrado
∇	Divergencia	por metro
$\nabla \times$	Rotacional	por metro

Tabla 3 Descripción del significado de cada símbolo y su unidad de medida en el SI.

Los patrones normales de las ondas de EEG suelen ser ondas sinusoidales. Estas oscilaciones están definidas por la frecuencia, el ancho de banda y por la potencia o amplitud de banda. Así, los parámetros utilizados para el análisis e interpretación de un EEG son los cambios de los diferentes ritmos corticales y el aumento o disminución de amplitud de la potencia de éstos. Los ritmos corticales se miden en ciclos por segundos (Hercios, Hz) y las diferentes bandas de frecuencia están asociadas a diferentes procesos cognitivos (Singer, 1999). Los factores que influyen del tamaño, la forma y la duración de las ondas de EEG son: 1) la distancia al electrodo de registro desde el generador; 2) la duración de potencial post-sináptico; 3) el número de potenciales post-sinápticos activados de manera sincrónica; y 4) la orientación anatómica de la capa de las células piramidales que están generando esta corriente (Schaul, 1998). La magnitud de las ondas de EEG se encuentra en niveles de μV con una amplitud que oscila entre $20\mu\text{V}$ (baja), $20\text{-}50\mu\text{V}$ (media) o mayor de $50\mu\text{V}$ (grande). Es necesario, por tanto, la amplificación del voltaje en el orden de un millón de veces (Epstein, 1997). Dicha amplificación se suele expresar como ganancia y se define como el resultado de multiplicar la amplificación por un voltaje constante. Se expresa, matemáticamente, como el cociente entre la señal de salida y la señal de entrada ($V_{\text{salida}}/V_{\text{entrada}}$).

La señal de EEG puede verse perjudicada por otras señales fisiológicas o interferencias producidas por elementos externos al registro, por tanto siempre se debe realizar el registro en una posición donde la persona que realiza el EEG se encuentre en una posición cómoda, relajada y lo más inmóvil posible. La consecuencia directa puede ser la difícil o imposible interpretación de los datos. Los ruidos pueden ser debidos, en primer lugar, a problemas técnicos como la fluctuación de la impedancia o el movimiento de los cables o, en segundo lugar, a artefactos fisiológicos. Se pueden diferenciar los siguientes tipos de artefactos fisiológicos:

- Artefacto electromiográfico: producido por la contracción muscular de la zona maxilar, orbicular y el cuero cabelludo. También afectan los movimientos musculares involuntarios como, por ejemplo, la actividad tónico-clónica.
- Artefactos de parpadeo: generados por los parpadeos de los ojos. Se registran principalmente los electrodos situados en las regiones frontales. Son fácilmente identificables.
- Artefacto glossofaríngeo: relacionado con la actividad de la lengua, la musculatura faríngea y esfelopalatina. Puede interpretarse como un brote de actividad lenta.
- Artefacto arterial: artefactos rítmicos que describen una onda con morfología de punta pulsátil y que registran la actividad de las arterias o arteriolas. Modificando la posición de los electrodos se elimina el artefacto.
- Artefacto electrocardiográfico: causado por la actividad miocárdica, refleja una actividad rítmica que se puede llegar a registrar en el cuero cabelludo.
- Artefactos eléctricos: suelen ser artefactos de mayor amplitud que el registro con forma picuda.

A pesar de la amplificación se debe realizar un filtrado de la señal para evitar la presencia de frecuencias no deseadas. Existen tres tipos de filtros: filtro paso bajo, filtro paso alto y filtro *notch*. El filtro *notch* es aquel filtro que no deja pasar una frecuencia específica (50/60Hz) y se encuentra relacionado con la corriente alterna o alimentación eléctrica. La diferencia entre los valores del filtro paso bajo y paso alto es el ancho de banda, que normalmente recoge las frecuencias entre 0.53 Hz y 70 Hz. Se considera que toda la información que no se encuentra en esas bandas es irrelevante. Sin embargo, estos valores son modificables por el experimentador. Estos tres filtros pueden utilizarse a la vez en forma de cascada.

En la actualidad, el EEG se puede combinar con otras técnicas neurofisiológicas como la resonancia magnética funcional (fMRI) o la estimulación magnética transcraneal (TMS), donde se complementa la resolución temporal con la espacial, para el diagnóstico o interpretación de procesos biológicos en la corteza cerebral. Son compatibles con técnicas de neuromodulación, lo cual permite un estudio más profundo de los posibles mecanismos biológicos de los procesos de plasticidad asociados a este tipo de técnicas.

2.1. EEG normal en vigilia

Los ritmos cerebrales se encuentran inducidos por fases entre la máxima y la mínima inhibición entre las poblaciones neuronales (Klimesch et al, 2007). Muchas enfermedades son capaces de ser diagnosticadas simplemente con la inspección visual

de un EEG ya que es posible una identificación rápida de una patología en la funcionalidad cortical, por ejemplo, la identificación de un estado epiléptico. El EEG en vigilia a veces es difícil de interpretar, por ello las características propias de este estado es la aparición de movimientos rápidos oculares, acompañados normalmente con un parpadeo y la actividad miogénica. La actividad encefalográfica se divide en cuatro bandas de frecuencias (delta, theta, alfa, gamma) cuyos ritmos pueden cambiar según los sujetos y su edad.

2.1.1. Ritmo Delta (δ)

Las frecuencias que describen estos ritmos son las frecuencias inferiores a 4 Hz. Están presentes en el sueño profundo en adultos siendo poco frecuentes en estado de vigilia. Esta frecuencia disminuye a medida que el ser humano envejece y sus ondas están relacionadas con desórdenes del SNC cuando se presentan en un adulto despierto (Kübler et al, 2001).

2.1.2. Ritmo Theta (Θ)

Este ritmo está representado por el rango de frecuencia entre los 4-7 Hz. Es por ello que también es conocido como frecuencia lenta. Esta banda se encuentra asociada a la concentración o meditación (Aftanas & Golocheikine, 2001), a procesos cognitivos como de cálculo (Fernández et al, 1995), de orientación (Caplan et al, 2001) y a estados de alerta (Klimesch et al, 2001). Al igual que con el ritmo δ su presencia en el EEG adulto indicaría problemas a nivel del SNC (Kübler et al, 2001).

2.1.3. Ritmo Alfa (α)

La actividad α se presenta fundamentalmente en las regiones occipitales de la corteza cerebral relacionadas con la función visual (Pineda, 2005). No obstante, esta actividad también se puede llegar a registrar en las regiones parietales, en la porción posterior de los lóbulos temporales (procesos de memoria) y en áreas frontales (procesamiento de información semántica y cognitiva) (Klimesch, 1997; 1999; Klimesch et al, 1997). El rango de esta frecuencia se encuentra entre 8-14 Hz, su actividad se induce cerrando los ojos o entrando en un estado de relajación (vigilia relajada) y, además, es un ritmo reactivo ante la apertura y el cierre palpebral. No obstante, los generadores de alfa todavía no han sido identificados. Hay que destacar que en esta banda de frecuencia es fácilmente distinguible por un pico y se suele identificar individualmente.

2.1.4. Ritmo Beta (β)

La localización del ritmo beta se encuentra en las regiones frontales, temporales anteriores y parietales. Su actividad está asociada con actividades motoras y con

sincronización entre las diferentes áreas cerebrales (Aumann & Prut, 2015). El intervalo de banda se encuentra entre los 15-29 Hz.

2.1.5. Ritmo Gamma (γ)

Este ritmo tiene frecuencias mayores de 30 Hz. Son las ondas que se encuentran relacionadas con altos niveles de funciones cognitivas como la atención (Fries et al, 2001), la memoria (Colgin et al, 2009) y la percepción (Rodríguez et al, 1999).

2.2. Electrodo y montajes

El electrodo es el receptor que capta la corriente bio-eléctrica que genera la actividad cerebral para posteriormente amplificarla y en los equipos modernos convertirla en señal digital. Los electrodos recogen la actividad, no sólo del área debajo del él, sino también de otras áreas y diferentes poblaciones neuronales. Por tanto, un mayor número de electrodos ayuda a una mejor resolución espacial.

Existen diferentes tipos de electrodos para registrar la actividad bioeléctrica cerebral los electrodos invasivos y no invasivos. Los electrodos no invasivos representan una técnica totalmente indolora y confortable se colocan sobre la superficie del cuero cabelludo. Estos electrodos son metálicos y normalmente necesitan la aplicación de un gel o pasta conductora para poder registrar la actividad de EEG. Existen otros tipos de electrodos de superficie que no necesitan la aplicación de gel o pasta conductora porque utilizan sistemas de pre-amplificación muy cercana al electrodo (dryelectrodes). Por otro lado, los electrodos invasivos se dividen en electrodos corticales (electrocortigrama) y profundos (electroencefalografía profunda). Es necesaria una operación quirúrgica para su colocación, por lo que su aplicación queda restringida a pocas aplicaciones clínicas y de investigación. Actualmente, en los registros de EEG se utilizan gorros que llevan incorporados los electrodos. De esta manera es posible registrar hasta un máximo de 256 canales simultáneamente de manera rápida y eficaz. Evidentemente, la mejora de la información a nivel temporal y el proceso de optimización de la señal está en relación con el número de dipolos posibles (Scherg & Von Cramon, 1986).

En 1947, se estandarizó la colocación de electrodos en el I Congreso Internacional de la Federación de EEG celebrado en Londres, donde se determinó lo que se califica como el SI 10-20 (Jasper, 1958). La colocación de los electrodos no es aleatoria y se encuentra a un 10% o un 20% de distancia de diferentes localizaciones anatómicas estándar del cráneo (porcentaje respecto a la medida total de la cabeza desde nacimiento o punto periauricular derecho-izquierdo). Las referencias anatómicas son el nacimiento, el nacimiento y el punto periauricular, las cuales permiten que se tracen ejes de

coordenadas para colocar los electrodos de manera exacta. En la numeración que se observa en el gorro, los números pares corresponden con el hemisferio cerebral derecho y los impares con el izquierdo. En cuanto a las letras, el significado corresponde con las áreas cerebrales donde se encuentran emplazados. Así, Fp y F representan las áreas frontales, las T las áreas temporales, las P las parietales, las O las occipitales y las C las centrales. La letra Z corresponde con los electrodos que se encuentran en la línea media (Fig. 5).

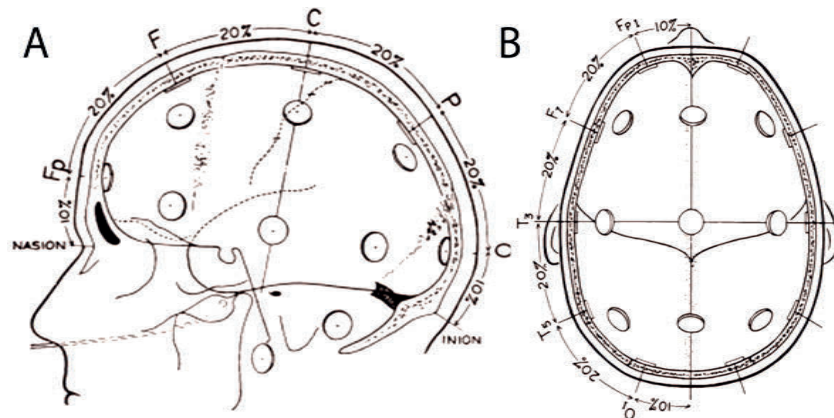


Fig. 5 Representación de la distribución de electrodos para el registro de EEG según el SI 10/20.

A) Visión sagital y **B)** Visión transversal del sistema de colocación de los electrodos basado en el 10% y 20% del total de la distancia entre las referencias anatómicas, nasión, inión y tragus. Las letras F, T, O, P y C hacen referencia a la localización de los electrodos (F-frontal; T-temporal; O-occipital; P-parietal; C-central) (Jasper, 1958).

Los canales que registran la actividad eléctrica siempre representan la diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos. Esta diferencia se denomina derivación o montaje. Para un óptimo registro, la impedancia debe mantenerse por debajo de los 10000 Ω (Usakli, 2010). Se pueden distinguir tres tipos de montajes diferentes:

- **Monopolar:** representa la diferencia entre un electrodo activo y un electrodo que se encuentra localizado normalmente en una zona donde no hay actividad eléctrica o la menor posible, normalmente suele ser el lóbulo de la oreja, mentón o mastoides. Si se registra más de un electrodo simultáneamente y todos ellos tienen como referencia el mismo electrodo, este montaje se denomina de registro de referencia común, la decisión de una derivación u otra depende siempre del objetivo del estudio, de la zona cortical que se desea registrar y del material disponible.
- **Bipolar:** consiste en la amplificación diferencial entre pares de electrodos activos. Cualquier señal común presente en ambos electrodos activos no se registrará porque se producirá una cancelación de fase.
- **Laplaciana:** en este caso se produce una diferencia de potencial entre un electrodo activo y una referencia, siendo en este caso el promedio de electrodos,

también activos, alrededor del primero. La distancia entre todos ellos debe ser la misma.

2.3. Técnicas de análisis

El análisis de EEG puede clasificarse en dos tipos diferentes. En primer lugar, en análisis de dominios de frecuencia donde se calcula la potencia media y se caracterizan los cambios a lo largo del tiempo. En segundo lugar, en análisis de dominios de tiempo relacionado con un evento en el tiempo que produce un potencial evocado, caracterizado por la latencia y la amplitud de éste.

2.3.1. Análisis de frecuencia

Las señales de EEG son señales complejas no estacionarias (Blanco et al, 1995), es decir, sus propiedades varían en función del instante de tiempo analizado. Para poder reflejar la variación en el tiempo de las características de un EEG se utiliza la representación tiempo-frecuencia. De este modo, se puede estudiar la evolución del contenido espectral de las señales EEG y cuantificar sus cambios (Rioul & Vetterli, 1991).

El algoritmo más utilizado para el análisis de este tipo de señales es la transformada de Fourier, el cual fue desarrollado por Jean Baptiste Fourier (Cooley & Tukey, 1965) donde se transforma el dominio tiempo en dominio frecuencia (FFT). Según su teorema, toda señal periódica se puede descomponer en un conjunto de ondas seno y coseno, con su amplitud, fase y frecuencia que, sumadas entre sí, reproducen la señal original.

$$F(f) = \int_{-\infty}^{\infty} y(t)e^{-j2\pi ft} dt$$

La FFT aplicada en el análisis de EEG nos permite caracterizar las señales de EEG a través de una expresión compleja que contiene la información de amplitud, fase y frecuencia de las diferentes funciones sinusoidales que componen dicha señal. El conjunto de frecuencias de la señal EEG forma el espectro de frecuencias. El módulo de la FFT nos da el espectro de amplitud y el ángulo nos da el espectro de fase que está relacionado con la posición de la señal en cada instante. Se suele utilizar el espectro de potencia o densidad espectral de potencia (PSD), que se calcula como el módulo al cuadrado de la FFT. Un segundo principio que se aplica a la hora de llevar a cabo el análisis de señales continuas es el basado en el teorema de frecuencia de muestreo o teorema de Nysquist (Nyquist, 1928). Este teorema enuncia que la frecuencia de muestreo debe ser al menos dos veces la frecuencia que se quiere analizar de la señal. En base a estos teoremas, las técnicas y análisis se han ido perfeccionando y

evolucionado a lo largo de estos años, dando lugar a mejoras tanto en el registro como en el análisis de los datos y, por tanto, la interpretación de procesos fisiológicos y patológicos.

2.3.2. Potenciales evocados (EP)

Un EEG registra la actividad espontánea cerebral de forma continua, pero también es capaz de documentar la actividad evocada cerebral asociada a la aparición de un evento. Esta actividad evocada se define como una fluctuación de voltaje relacionada con la aparición de un estímulo sensorial, motor o cognitivo cuya magnitud es mucho menor ($1\text{-}20\text{ }\mu\text{V}$) que la actividad espontánea dentro de un registro de EEG ($0.5\text{-}100\text{ }\mu\text{V}$) (Coles & Rugg, 1995). La forma de los potenciales es una secuencia de deflexiones positivas y negativas, y se pueden dividir según el tipo de estímulo que evoca la actividad. Los potenciales denominados exógenos son aquellos evocados con estímulos externos (estímulo visual, somatosensorial o auditivo) y su latencia se encuentra como máximo antes de los 50 ms, mientras que los potenciales endógenos son aquellos relacionados con procesos cognitivos o actividad motora, y su latencia suele ser mayor de 100 ms (Coles & Rugg, 1995). Las componentes con una latencia menor de 100 ms se consideran componentes tempranas con la característica de ser altamente reproducibles interindividualmente (Halliday, 1993), reflejando la llegada de un estímulo sensorial a S1.

La frecuencia y el número de estímulos para evocar un EP varían dependiendo de las componentes que se quieren estudiar (Kimura, 2013). Los componentes de corta latencia necesitan una media de 4000 estímulos evocados a 3-4 Hz para una resolución óptima, mientras que las componentes de media y larga latencia (20-200ms) necesitan sólo 200-400 estímulos de media a una frecuencia menor (1-2 Hz) (Kimura, 2013).

La señal de un EP debe ser procesada para poder ser evaluada. En primer lugar, es necesario que el estímulo que evoca el potencial sea presentado de manera repetida para crear una variación de la actividad eléctrica y ésta se superponga a la actividad de EEG espontánea. En segundo lugar, se debe promediar el segmento de la señal relacionado con el evento que evoca la respuesta, este intervalo se debe adecuar a cada tipo de potencial que se quiere cuantificar (ms) (Cacioppo et al, 2007). De este modo, en el promedio toda oscilación no asociada con el evento se cancelará, quedando sólo presente la actividad evocada. Por último, es imprescindible una amplificación de la señal ya que este tipo de señales poseen amplitudes muy pequeñas (μV). También es necesaria la aplicación de filtros de banda que eviten la aparición de ruidos durante el registro (Regan, 1989). Los estímulos deben de encontrarse calibrados, en cuanto a su intensidad y aparición, para cada tipo de diana a estimular. Además, es conveniente evitar cualquier tipo de aprendizaje o expectación con el fin de evitar la aparición de

potenciales que no se deseen valorar (Picton et al, 2000). Además se puede llevar a cabo un estudio topográfico de cómo se encuentra distribuido el potencial sobre la corteza. Este mapa cerebral nos ayuda a determinar si más de una componente contribuye a la diferencia de voltaje y los puntos de máxima actividad en un tiempo determinado (Picton et al, 2000).

Por otro lado, las oscilaciones de alta frecuencia (HFO, sus siglas en inglés) son las oscilaciones asociadas a la componente cortical N20 cuando se evocan potenciales somatosensoriales. La frecuencia de las HFO es alrededor de 600 Hz (Cracco & Cracco, 1976; Curio et al, 1994; Hashimoto et al, 1996). El pico de N20 determina las dos subclases de HFO, la temprana HFO (*early HFO*), antes de la N20 hasta el *onset-point* y la tardía (*late HFO*) entre la N20 y el *offset-point*, cuyo origen se ha propuesto que es diferente. La componente temprana se relaciona con la actividad tálamo-cortical y neuronas piramidales, mientras que la componente tardía se vincula con la actividad inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas de las capas superficiales (Gobbelé et al, 1998; Hashimoto et al, 1999; Hashimoto et al, 1996; Jones & Barth, 2002; Jones et al, 2000; Klostermann et al, 2002; Ozaki et al, 2001). El análisis de este tipo de señal depende de la frecuencia de muestreo con la que se haya hecho el registro, como mínimo es necesario haber registrado con una frecuencia de muestreo de 2000 Hz. Además, con frecuencias mayores de 20000 Hz se podrán sacar HFO para cada estímulo individualizado. El preprocesamiento de la señal consiste en realizar una interpolación para eliminar el artefacto de estímulo y luego aplicar un filtro de banda (~400-1000 Hz) (Waterstraat et al, 2015).

2.3.2.1. Potenciales evocados somatosensoriales (SEPs)

La estimulación eléctrica del nervio mediano tiene asociados la aparición de un SEPs. Idealmente los nombres de las diferentes componentes deberían de indicar los generadores/fuentes neuronales. Sin embargo, muchos de los picos siguen sin ser claros. Las ondas con latencia temprana se encuentran generadas en S1 son P19, N20, P25 y N30 (Allison et al, 1989; Allison et al, 1991). No obstante, las ondas tardías (P45, N60, P100) son generadas probablemente por el área contralateral S1 (Allison 1992). Los picos positivos y negativos posteriores a P14 muestran una menor latencia en los electrodos frontales (N18, P20, N29) con un progresivo retraso hacia las áreas centrales (N19, P22 y N32) y parietales (N20, P26 y N34). Hay que destacar que la latencia de la misma componente cambia interindividualmente reflejando diferentes longitudes de las vías somatosensoriales (Kimura, 2013).

El origen de los potenciales de corta latencia corresponde con:

- N13 o potencial ERB. El pico representa el potencial que se registra a nivel cervical reflejando la actividad postsináptica del cordón cervical (Desmedt & Cheron, 1981b; Emerson et al, 1984; Lueders et al, 1983a).
- P14 es un potencial subcortical relacionado la actividad de la actividad del lemnisco medial caudal (Desmedt & Cheron, 1980; 1981a; Emerson et al, 1984; Mauguière & Courjon, 1981).
- N18 es una componente subcortical que refleja la actividad postsináptica de diferentes fuentes generadoras del tronco del encéfalo y probablemente del tálamo (Desmedt & Cheron, 1980; 1981a; Tomberg et al, 1991).
- N20 corresponde con la activación de S1 cuando llega el potencial asociado a la estimulación a la corteza (área 3b) con un tiempo aproximado de 20 ms (Allison & Hume, 1981; Desmedt & Cheron, 1981a; Hume & Cant, 1978; Lueders et al, 1983b; Mauguière et al, 1983a; b). Se encuentra localizado en la región parietal donde su polaridad se invierte a través de la fisura central, además en las regiones frontales o centrales la latencia es ligeramente superior que en la zona parietal. En Pc representa la mayor deflexión negativa seguido de un pico positivo P25.
- Aunque el origen exacto de la componente N30 se desconoce, unos autores abogan por que procede de regiones precentrales (Allison et al, 1989), mientras que otros defienden una localización suplementaria de M1 (Desmedt & Bourguet, 1985; Mauguière et al, 1983a). Esta componente es altamente sensible a las actividades mentales motoras o sensoriales (Cheron & Borenstein, 1987; 1991; 1992; Cheron et al, 2000).

Además, la actividad eléctrica inducida periféricamente produce un potencial de acción sensorial (SAP), el cual se puede registrar con unos simples electrodos colocados a nivel muscular.

3. Estimulación cortical

3.1. Antecedentes

El desarrollo del sistema nervioso y su funcionalidad son dos de los campos centrales en la investigación actual en la neurociencia. No obstante, ha sido necesario el estudio continuado durante varios siglos para concluir que el cerebro es el órgano que integra y procesa la información y que, a su vez, lleva a cabo la toma de decisiones. Esta afirmación actual difiere, por ejemplo, de la idea de Aristóteles, quien en la antigua Grecia atribuía el intelecto al corazón.

La estimulación cortical es una técnica que comenzó en el siglo XVIII, no como tratamiento de enfermedades sino como herramienta para poder comprender y estudiar el SNC. El hallazgo de la capacidad eléctrica del SNC fue descrito por el profesor Galvani (Galvani & Aldini, 1792). En sus experimentos originales, Galvani indujo contracciones musculares en las ranas mediante descargas eléctricas aplicadas dentro de los nervios. En la teoría final que propuso, enunció que el cerebro genera electricidad y la distribuye a través de los nervios hacia los músculos (Galvani & Aldini, 1792; Parent, 2004). Sus resultados fueron acogidos con gran interés por la comunidad científica, aunque poco después surgió una controversia con un científico coetáneo, Volta, quien criticó la interpretación de sus resultados (Parent, 2004). Sin embargo, fue su sobrino Aldini quien continuó la labor de su mentor Galvani y terminó acuñando el concepto de electricidad animal o galvanismo en 1802 al aplicar electricidad con una pila de Volta sobre las cabezas de presos decapitados, provocándoles así contracciones musculares (**Fig. 6**) (Aldini, 1804; Parent, 2004). Estas observaciones le permitieron afirmar que la corteza cerebral era eléctricamente excitable. Poco después, Aldini empezó a utilizar la estimulación eléctrica como una técnica terapéutica en sujetos con desórdenes mentales como sucedió, por ejemplo, en el caso en que se aplicó corriente eléctrica a un paciente con depresión mayor, quien evolucionó positivamente varias semanas después de empezar el tratamiento (Aldini, 1804; Parent, 2004). Curiosamente, un efecto que Aldini describió pero que terminó cayendo en el olvido fue la contralateralidad, es decir, la contracción muscular del lado contralateral al de la aplicación eléctrica. Sin embargo, no fue hasta los trabajos de Fritsch e Hitzig por un lado, y de Ferrier por el otro en 1870, cuando se demostró que la corteza cerebral era la encargada de la inervación de los músculos periféricos contralaterales de manera somatotópica (Ferrier, 1873; Fritsch & Hitzig, 1870; Zago et al, 2008) . De esta manera, se forjó, por tanto, la visión moderna de la fisiología cortical.

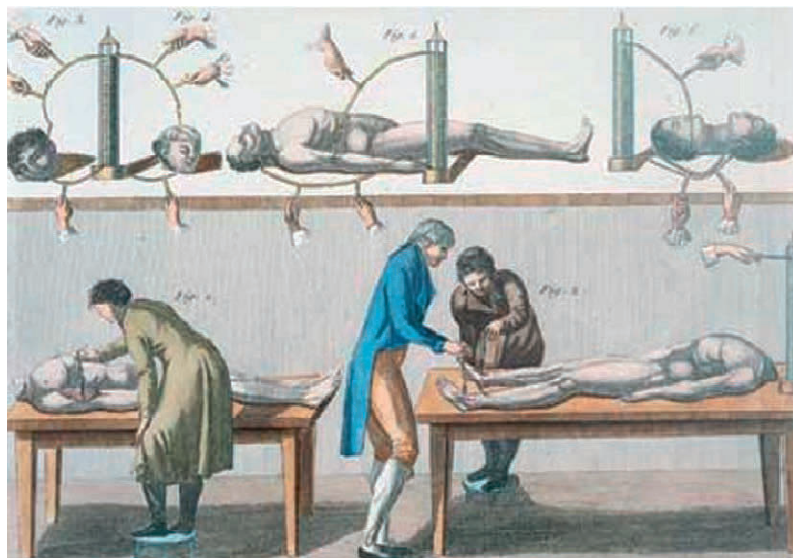


Fig. 6 Pintura que muestra como Aldini aplicaba electricidad a los cuerpos decapitados. (Aldini, 1804).

También en el año 1870, en estudios realizados en pacientes con epilepsia, el Dr. Jackson concluyó que dentro de la propia corteza motora existían diferentes áreas anatómicas. Esta idea fue fundamental para explicar la propagación de la sintomatología de las crisis epilépticas cuando comienzan en una zona anatómica y terminan en otra (por ejemplo, la propagación desde los dedos hasta la cara pasando por el brazo, hombro y tronco). En 1874, el Dr. Roberts Bartholow fue el primero en estimular directamente la corteza cerebral de una paciente despierta, que tenía el cerebro expuesto por un tumor, sobre el que aplicó corriente galvánica directamente. Por un lado, describió la insensibilidad al dolor de la duramadre y del cerebro y, por otro, dejó constancia de los efectos producidos por la estimulación sobre la circunvolución postcentral del cerebro, evocando contracciones musculares en el hemicuerpo contralateral. Además, observó que al aumentar la intensidad de la estimulación, la paciente lloró e incluso llegó a convulsionar (Bartholow, 1874; Zago et al, 2008). Finalmente, la paciente terminó muriendo varios días después a consecuencia del procedimiento, el cual despertó controversia sobre los límites morales y éticos de la ciencia.

Ya en el siglo XX, la primera terapia electro convulsiva se aplicó para el tratamiento de enfermedades mentales tales como la depresión mayor introducido por el Dr. Hugo Cerletti en el año 1933. Dos décadas después, en 1954, Patton y Amassian aplicaron pulsos de estimulación eléctrica directa sobre el tracto piramidal en mono. Tras un estímulo eléctrico (corriente anódica) sobre la corteza motora, se registró a nivel bulbar un potencial de corta latencia (onda D), seguido de unas ondas pequeñas y tardías (ondas I) de latencias variables. Sin embargo, observaron que si extraían la materia gris del cerebro, no era posible registrar estas ondas I. Por tanto, concluyeron que las ondas D eran el resultado directo de la excitación de las neuronas piramidales, mientras que

las ondas I representaban la actividad transináptica de dichas neuronas con una periodicidad de ~ 600 hercios (Hz) (Patton & Amassian, 1954).

A excepción de la ya mencionada terapia electro-convulsiva en los años 30, no fue hasta los años 80 en que, de la mano de Merton y Morton, se realizaron los primeros estudios de estimulación eléctrica en humanos de manera no invasiva mediante estimulación eléctrica transcraneal (TES) sobre la corteza motora (Merton & Morton, 1980). La TES consiste en un pulso veloz de alto voltaje, aplicado sobre el cráneo intacto. Por un lado, el ánodo se coloca sobre M1, concretamente en la localización correspondiente al músculo diana y, por el otro, el cátodo se sitúa en el vértex. Así, se registran los potenciales evocados musculares (MEPs) que la corriente eléctrica genera al despolarizar los axones de la vía piramidal. No obstante, hay que destacar que la corriente eléctrica, además de tener una dirección directa entre ánodo y cátodo, también se dispersa a través de los tejidos en dirección tangencial y radial, desconociéndose los posibles efectos en áreas cerebrales adyacentes. Esta técnica produce un intenso dolor debido a la contracción de gran intensidad de los músculos faciales y craneales producida por la corriente eléctrica. El problema del dolor asociado a la estimulación se resolvió con el desarrollo de la TMS. El estimulador fue desarrollado por Anthony Barker, siendo capaz de evocar MEP sobre la corteza motora intacta sin dolor asociado gracias a la inducción de potenciales de acción por el paso de una corriente electromagnética perpendicular al cuero cabelludo (Barker et al, 1985). Experimentos posteriores demostraron que la TMS produce una excitación de los axones cortico-espinales a nivel subcortical en la sustancia blanca, lejos de los somas neuronales (Di Lazzaro et al, 1999; Di Lazzaro et al, 1998).

Los MEPs se han convertido en la medida utilizada para valorar los cambios de excitabilidad cortical, así como la actividad cortico espinal. Su composición depende de la intensidad y de la naturaleza del estímulo (eléctrico o magnético) y, en el caso de la TMS, de la dirección de la corriente, ya que la TMS y la TES pueden activar diferentes circuitos o incluso el mismo circuito en distintas zonas dentro de la corteza motora (Di Lazzaro et al, 2001). Por tanto, estas técnicas se han convertido en herramientas neurofisiológicas fundamentales para investigar y/o valorar la excitabilidad cortical y la conducción nerviosa.

3.2. Técnicas de neuromodulación no invasivas

El enfoque de la estimulación cortical ha evolucionado y, además de ser una herramienta que ayuda a valorar cambios de excitabilidad cortical, es también capaz de inducir cambios de actividad cortical aumentando o disminuyendo su excitabilidad, en función de los parámetros utilizados, como por ejemplo la intensidad o frecuencia del estímulo. Actualmente, la estimulación cortical no invasiva (NIBS) se propone como tratamiento paralelo, por ejemplo, a los tratamientos farmacológicos y/o a la

rehabilitación convencional en patologías tales como la depresión, el dolor neuropático y el ictus (Fregni & Pascual-Leone, 2007; Lefaucheur et al, 2014).

3.2.1. Estimulación Magnética Transcraneal (TMS)

Anthony Barker diseñó un estimulador magnético en el año 1985, que consistía en la descarga de una corriente eléctrica sobre una bobina de alambre. En él, una gran cantidad de corriente fluye a alta velocidad, produciendo un campo magnético de hasta 2 Teslas (T) de intensidad en torno a la bobina. Si ésta se colocaba sobre M1, se vio que capaz de evocar un potencial motor en ausencia de dolor (Barker et al, 1985). Conceptualmente, la estimulación magnética se basa en la ley de Faraday, teoría que sostiene que la inducción electromagnética viene determinada por el paso de una corriente eléctrica a través de un conductor.

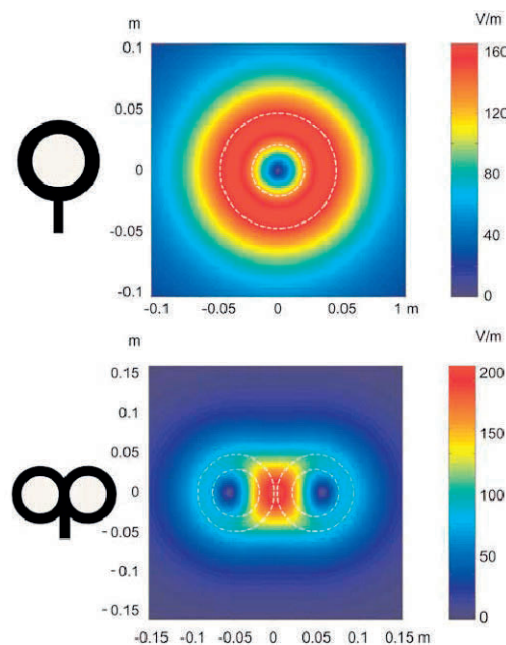


Fig. 7 Representación de los dos tipos de bobinas más utilizadas.

La geometría de las bobinas determina la distribución de la energía inducida, mientras que la bobina circular distribuye el campo electromagnético de manera uniforme bajo ella, la bobina en forma de ocho focaliza esta donde convergen las dos circunferencias que forman el ocho (Pascual-Leone & Tormos-Muñoz, 2008).

El funcionamiento de las bobinas de estimulación se basa en que poseen un hilo conductor recubierto de material aislante. Sin embargo, es la geometría lo que determina la penetración y distribución de la estimulación electromagnética (**Fig. 7**) (Pascual-Leone et al, 2002). Las líneas de flujo producidas por un campo magnético son perpendiculares al plano del campo, por lo que la superficie de estimulación debe encontrarse tangencial al plano del campo. Esta corriente pasa a través de las diferentes estructuras anatómicas (piel, hueso y líquido cefalorraquídeo) hasta llegar a las neuronas, que es un tejido conductor. Un pulso electromagnético sobre las neuronas

induce una corriente iónica/eléctrica secundaria en los tejidos conductores y puede ser descrita matemáticamente como la derivada espacial del campo eléctrico a lo largo del nervio (Pascual-Leone et al, 2002).

El pulso simple consiste en un único pulso magnético de alta velocidad que, según la intensidad del estímulo, despolariza a una mayor o menor población de neuronas que se encuentre tangencial a este estímulo. Dependiendo de la corteza estimulada, la despolarización de las neuronas produce un potencial evocado específico. Por ejemplo, en la corteza visual se evocan fosfenos mientras que en la corteza motora se produce potenciales motores. La intensidad necesaria para poder estimular la corteza cerebral es, aproximadamente, 7-10 kA (Pascual-Leone & Tormos-Muñoz, 2008). El pulso simple, además de evocar respuestas para valorar la excitabilidad cerebral, puede utilizarse para otras aplicaciones más complejas como son los mapeos corticales (Bashir et al, 2013; Wassermann et al, 1992), las curvas de reclutamiento (Ridding & Rothwell, 1997), así como para valorar el período de silencio (Triggs et al, 1992). Si se asocian dos pulsos simples formando un pulso pareado, se pueden valorar otros efectos fisiológicos como la facilitación y la inhibición intracortical, dependiendo del intervalo entre estímulos. En primer lugar, se describió la inhibición intracortical de larga latencia con un rango interestímulo entre 50-200 ms (Valls-Solé et al, 1992). Un año más tarde Kujirai *et al* observaron que si el rango interestímulo se encuentra a menos de 5 ms entre ellos se presenta un efecto denominado inhibición intracortical de corta latencia (*short latency intracortical inhibition*, SICI), mientras que si este rango aumenta entre 8-30 ms, el efecto que se produce es una facilitación intracortical (Kujirai et al, 1993). Por último, si dos pulsos estimulan ambas cortezas M1 con intervalos comprendidos entre 8-50 ms, se produce una inhibición trascallosal (Ferber et al, 1992; Gerloff et al, 1998). No obstante, también se puede asociar con un pulso eléctrico para valorar la inhibición corta aferente (Tokimura et al, 2000). Actualmente, la TMS se utiliza como medio de diagnóstico de diversas patologías neurológicas, como por ejemplo dolor crónico, desórdenes de movimiento e ictus entre otros (Chen et al, 2008).

3.2.2.1. Paradigmas de estimulación

Los paradigmas de estimulación se diferencian entre ellos por la frecuencia de aparición de los pulsos. Estos pueden ser pareados de igual o diferente intensidad, aparecer de forma repetida, en ráfagas o asociados a una estimulación eléctrica. El criterio para la utilización de un paradigma u otro vendrá determinado por la diana de tratamiento, así como por la patología a tratar.

3.2.2.1.1. Estimulación magnética transcraneal repetitiva (rTMS)

Se conoce como rTMS a la estimulación repetida de pulsos electromagnéticos de, como mínimo, 1 pulso/s durante 20 s consecutivos. Esta aplicación induce cambios plásticos a largo plazo, homólogos a la LTP y LTD descritos *in vitro* (Siebner & Rothwell, 2003; Ziemann, 2004), dependiendo de los parámetros utilizados como frecuencia, intensidad y duración del estímulo (Kobayashi & Pascual-Leone, 2003). Así, una estimulación de baja frecuencia (LF; $\leq 1\text{Hz}$) aplicada en M1 tiene un efecto inhibitorio (Chen et al, 1997; Maeda et al, 2000; Pascual-Leone et al, 2000). Por el contrario, si la frecuencia aplicada es alta (HF; $\geq 5\text{Hz}$), el efecto que se observa es el opuesto: un aumento de la excitabilidad (Pascual-Leone et al, 1994). Estos efectos también han sido confirmados posteriormente en otras áreas corticales como, por ejemplo, la corteza dorsolateral (DLPC) o la corteza prefrontal (Kobayashi & Pascual-Leone, 2003).

3.2.2.1.2. Estimulación transcraneal Theta Burst (TBS)

La TBS consiste en la aplicación repetida de estímulos electromagnéticos que se presentan en trenes de impulsos (3 pulsos) a 50 Hz a su vez repetidos cada 200 ms (5 Hz). Este protocolo fue desarrollado por Huang (Huang et al, 2005) tras la realización previa de un estudio que demostró la seguridad de la estimulación mediante un tren de estímulos sencillo de rTMS con baja intensidad a 50 Hz en M1 (Huang & Rothwell, 2004).

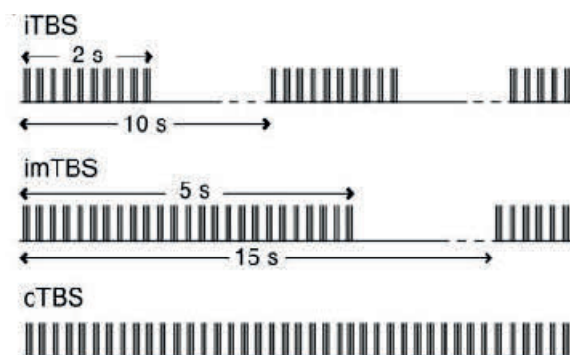


Fig. 8 Protocolos correspondientes con la estimulación *theta burst*. Muestra la diferente distribución de trenes de impulsos (3 pulsos) para los diferentes protocolos que engloban la estimulación *theta burst* (Huang et al, 2005).

En la **Fig. 8** se muestran los diferentes protocolos que se pueden utilizar con la TBS (Huang et al, 2005). En primer lugar, iTBS hace referencia a la estimulación intermitente, donde se presentan trenes de pulsos de 2 s repetidos cada 10s, con una duración total de estimulación de 190s. A continuación, imTBS significa TBS intermedia. En este caso el protocolo consiste en 5 s de estimulación repetida cada 15 s, con una duración total de 110s. Por último, cTBS corresponde a la estimulación continua TBS, donde se presenta la estimulación continua durante 40 s. El número total

de pulsos en todos los protocolos es 600. No obstante, el efecto observado es opuesto entre la iTBS y cTBS; mientras que en la iTBS se produce un aumento de la excitabilidad cortical, en el caso de la cTBS, el efecto generado es una disminución de la excitabilidad. Por último, en el protocolo restante no se observa cambio alguno en la excitabilidad cortical.

3.2.2.1.3. Estimulación transcraneal cuadripulso (QPS)

En 2007 se describió el efecto de una estimulación con cuatro pulsos magnéticos monofásicos con un intervalo de 1,5 ms repetidos cada 5 s (Hamada et al, 2007). Se observó un aumento de la excitabilidad durante los primeros 90 min después de la estimulación. Posteriormente, el mismo grupo profundizó e investigó los efectos en la excitabilidad cortical con diferentes rangos de tiempo interestímulos, comprendidos entre 1,5-1250 ms (Hamada et al, 2008). Se observó que en los intervalos de 1, 5,5 y 10 ms se producía un incremento de la excitabilidad, mientras que el efecto era el opuesto en intervalos de mayor duración (30, 50, 100 ms). Por otro lado, no hubo cambio alguno cuando la duración interestímulo correspondía a 1250 ms.

3.2.2.1.4. Estimulación pareada asociativa (PAS)

La PAS consiste en la aplicación de un estímulo eléctrico sobre un nervio periférico, seguido de un pulso de TMS en corteza cerebral. El intervalo entre los dos estímulos puede variar entre 10 ms y 25 ms. Los efectos que se observan con los diferentes tiempos son opuestos: mientras que el primero produce una disminución de la excitabilidad cortical, el segundo provoca un aumento (Kujirai et al, 2006; Stefan et al, 2002; Stefan et al, 2000).

3.2.2. Estimulación transcraneal por corriente directa (tDCS)

La estimulación cortical con corriente directa (DC) ha sido estudiada ampliamente en animales, produciendo una disminución de la excitabilidad cortical tras la aplicación de una corriente catódica y un aumento de la excitabilidad tras una corriente anódica (Bindman et al, 1962; Purpura & McMurtry, 1965). Estos efectos se deben a un cambio en el estado de las neuronas. De este modo, el aumento de la excitabilidad se produce por una despolarización del potencial de membrana, mientras que la disminución se debe a un efecto de hiperpolarización de la misma. No obstante, estos efectos dependen de la interacción de la dirección de la corriente y la geometría neuronal (Purpura & McMurtry, 1965). La aplicación de DC transcranealmente de manera no invasiva tuvo lugar por primera vez en el año 2000 ya que su uso se encontraba limitado hasta entonces a estudios con animales, sin tener en cuenta el electroshock (Nitsche & Paulus, 2000). En ese estudio pionero, la diana de tratamiento fue M1 (electrodo activo) y el electrodo de referencia fue colocado pre-orbitalmente en el lado contralateral. La

superficie estimulada fue de 35 cm² con una intensidad de 1 mA y observaron que los efectos serán dependientes de la polaridad de la corriente, al igual que en los estudios previos realizados en animales (**Fig. 9**) (Nitsche & Paulus, 2000).

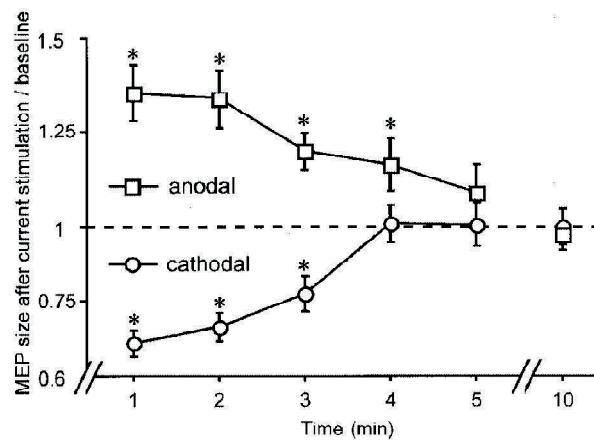


Fig. 9 Comparación del efecto de la estimulación anódica y catódica. Esta representación a lo largo del tiempo después de una aplicación de tDCS de 5 min a 1 mA muestra un aumento de la excitabilidad asociado a la corriente anódica y un efecto opuesto con la corriente catódica. Dicho efecto se prolonga 4 min después del fin de la estimulación (Nitsche & Paulus, 2000).

Hay que destacar que existe una asociación no lineal entre la intensidad de la estimulación y la dirección de los efectos. Por ejemplo, cuando se aplicó la corriente catódica en M1 y la referencia en la zona pre-orbital contralateral (2 mA durante 20 min) se observó un aumento de la excitabilidad y no una disminución como cabría esperar (Batsikadze et al, 2013; Moliadze et al, 2012). Además, trabajos recientes han mostrado la gran variabilidad de esta estimulación. Por ejemplo, en un estudio realizado por el grupo de Rothwell se mostró cómo un 50% de los sujetos estimulados en reposo con DC (corriente de 2 mA sobre M1) presentó una respuesta pobre o una ausencia de ella (Wiethoff et al, 2014). Otros estudios farmacológicos han demostrado que los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y el sistema GABAérgico son los responsables de los efectos a largo plazo (Liebetanz et al, 2002; Nitsche et al, 2003a; Nitsche et al, 2004).

La DC ha seguido siendo desarrollada como técnica y han aparecido dos variantes recientes: la estimulación transcraneal por corriente alterna (tACS) (Antal et al, 2008) y la estimulación transcraneal por corriente randomizada (tRCS) (Terney et al, 2008). Ambas se aplican de forma transcraneal mediante electrodos conductores de electricidad. La diferencia entre estas tres corrientes galvánicas radica en la dirección de corriente: mientras que en la tDCS los electrones van siempre del polo negativo al positivo, en la tACS la dirección de la corriente cambia alternamente con una frecuencia comprendida entre 1 y 45 Hz. A nivel fisiológico el efecto parece ser más débil que la tDCS, aunque posteriormente se demostró que, con rangos de frecuencias más elevadas

(1, 2 y 5 kHz), se aumenta la excitabilidad en M1 (Chaieb et al, 2011). Por otro lado, la tRCS se induce mediante una corriente oscilatoria al azar entre el electrodo positivo y el negativo. De igual manera que el protocolo precedente, también produce un aumento de la excitabilidad cuando se estimula M1.

4. Magnetismo

4.1. Introducción

El momento y lugar exacto del descubrimiento del magnetismo es incierto, aunque la creencia más extendida acerca de su origen sostiene que la palabra magnetismo procede del lugar donde fueron descubiertas unas piedras capaces de atraer pedazos de hierro (magnetita, F_3O_4), llamado Magnesia en Asia menor (Häfeli, 1998). Sin embargo, la primera referencia al magnetismo en occidente de la que hay constancia, tuvo lugar alrededor del año 1200 aC (Häfeli, 1998). A raíz de su descubrimiento, la primera aplicación clave conocida fue para la orientación de la navegación. En el año 1289 dC el francés Petrus Peregrinus estableció los principios básicos de las fuerzas magnéticas (Häfeli, 1998), los cuales son:

- Solamente atraen aquellos materiales con propiedades magnéticas.
- No es necesario el contacto directo ya que la fuerza magnética actúa a distancia.
- Entre los dos polos iguales de dos imanes se establecen fuerzas de repulsión, mientras que entre los polos opuestos, se producen fuerzas de atracción.
- El polo norte de un imán apunta hacia el polo norte terrestre.

Más tarde en el siglo XVII, el inglés William Gilbert haría el primer gran análisis sistemático del magnetismo en su estudio “*De magnete*” (Gilbert, 1958), considerada la primera obra de física experimental, donde se describió que la tierra se comporta como un dipolo. La relación entre electricidad y magnetismo fue descrita por el científico Hans Christian Oersted en 1819 cuando, tras exponer una brújula cerca de la circulación de una corriente eléctrica, vio cómo la aguja de la brújula sufría una reorientación. Por tanto, concluyó que una corriente eléctrica que circula por un conductor rectilíneo induce un campo magnético circunferencial alrededor de éste (Oersted, 1820). En esa misma época, el físico francés Ampère contribuyó al estudio del magnetismo y realizó observaciones claves para el devenir del campo. Descubrió el efecto mecánico de repulsión y atracción entre dos conductores recorridos por una corriente eléctrica con la misma u opuesta dirección (Ampère, 1826). No obstante, las leyes físicas básicas de la relación entre magnetismo y electricidad (Teoría de la inducción electromagnética) fueron desarrolladas por Michael Faraday y Joseph Henry. Esta teoría hace referencia a la producción de una fuerza electromotriz en un medio o cuerpo (por ejemplo, una bobina de alambre) expuesto a un campo magnético variable, o de manera opuesta, en un medio móvil respecto a un campo magnético estático. El movimiento, ya sea del imán o de la bobina, es la fuerza que se requiere para inducir una corriente electromagnética, es decir, es el movimiento relativo entre una y otra lo que genera dicha corriente.

4.2. Características de los campos magnéticos. Definiciones, ecuaciones y sistemas de unidades magnéticas

La capacidad magnética de la materia reside en el movimiento de los electrones orbitando alrededor del núcleo, los cuales generan una corriente eléctrica microscópica capaz de inducir un campo magnético. Además, existe otro movimiento, el del electrón sobre sí mismo, denominado giro o espín (del inglés, *spin*), que también produce un campo magnético. Cuando la materia adopta estructuras más complejas, su capacidad magnética final depende de la disposición de sus electrones, es decir, si sus espines quedan alineados, la materia tendrá propiedades magnéticas; si por el contrario, los espines circulan en órbitas opuestas, el campo magnético final será nulo. Generalmente, la materia se puede dividir en tres grupos diferenciados, según su comportamiento magnético:

- Materiales diamagnéticos. La totalidad de sus electrones se encuentran apareados. Por tanto, son capaces de repeler otros materiales como, por ejemplo, el bismuto (Morrish, 2001).
- Materiales paramagnéticos. Los espines tienden a alinearse de manera paralela a un campo magnético. Sin embargo, bajo una influencia nula de campos magnéticos, sus espines se encuentran en una disposición al azar. La permeabilidad magnética de estos materiales es, aproximadamente, la del vacío y pueden ser atraídos por fuerzas magnéticas. No obstante, no permanecen magnetizados sin la presencia de dichas fuerzas (Morrish, 2001).
- Materiales ferromagnéticos. El ferromagnetismo no se explica sólo por las propiedades de sus átomos individuales, sino por su comportamiento macroscópico dentro del material. Los átomos individuales tienen la propiedad de orientar sus orbitales combinando de forma aditiva cada uno de sus campos magnéticos, sin cambiar por ello sus posiciones dentro de la red cristalina. Dichas propiedades están relacionadas además con la capacidad de estos elementos de reorientar sus orbitales dentro del material. Una de las teorías desarrolladas para explicar este singular comportamiento es la teoría de los dominios magnéticos (Morrish, 2001).

Aunque existe una estrecha relación entre las leyes físicas de los campos magnéticos y eléctricos, también se pueden destacar diferencias importantes. En los campos magnéticos no es posible aislar una carga como sucede en un campo eléctrico, donde se puede llegar a aislar una carga positiva o negativa, ya que las líneas de flujo son continuas y no existe un comienzo o final. Por tanto, nos encontramos siempre dos polos (norte y sur) en un campo magnético. Curiosamente, aunque se subdivide el campo en dos, por ejemplo creado por un imán, seguirán apareciendo dos polos norte y

sur en cada trozo de los nuevos imanes. La interacción entre dos polos magnéticos se basa en las fuerzas que se establecen entre éstos. Dichas fuerzas pueden ser de repulsión si los polos son de la misma carga, o de atracción si son diferentes. No se necesita un contacto físico para que actúen por lo que podemos afirmar que son fuerzas que ejercen su acción a distancia.

La dirección del campo magnético se encuentra indicada por las líneas de fuerza, las cuales son líneas de fuerzas cerradas y que, por mecanismos de convención, se inicia en el polo norte y se dirige su recorrido hacia el polo sur. La distribución de la fuerza se presenta en líneas que convergen en aquel punto donde el campo magnético posee su mayor fuerza, y se dispersa donde es más débil. La cantidad de líneas magnéticas que se encuentra en una superficie se denomina densidad de líneas magnéticas, existiendo una proporción directa entre la cantidad de líneas de fuerzas presentes y la intensidad del campo magnético (**Fig. 10**).

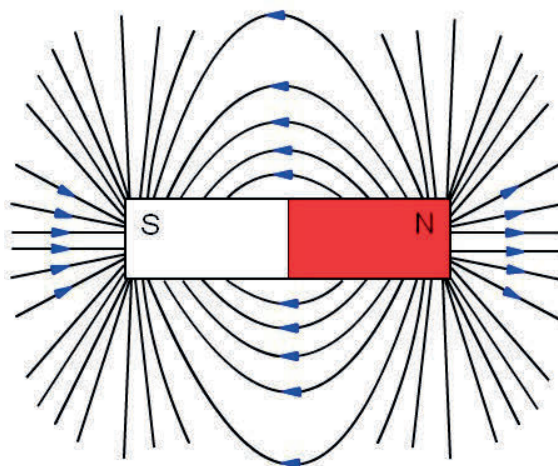


Fig. 10 Representación de las líneas de campo de un imán y su distribución. Las líneas de campo se originan en el polo negativo (N) y se dirigen hasta el polo positivo (P) creándose líneas de campo cerradas.

Los campos magnéticos están definidos por dos vectores: la fuerza del campo (H) y la densidad de flujo (B). Ambos vectores se encuentran relacionados directamente gracias a la constante μ (constante de permeabilidad magnética). La permeabilidad magnética se expresa como el cociente entre el campo total que existe dentro del material y el campo aplicado externamente. En caso de tejidos biológicos, esta permeabilidad es igual al valor de la permeabilidad en el vacío ($\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ (T/A}^{-1}\text{)}$).

$$B = \mu H$$

Además, las partículas en movimiento o cargadas eléctricamente que están dentro de un campo magnéticos se encuentran influenciadas por éste. La ley física que define esta interacción se denomina Fuerza de Lorentz (F), la cual establece una relación directa

entre la carga (q), la velocidad de la partícula (v) y el campo magnético donde se encuentra (B) (Lorentz, 1937).

$$F = qv \times B$$

Las unidades utilizadas en el magnetismo pueden ser Gauss (G) o Teslas (T) en el SI.

$$1G = 10^{-4}T$$

$$1T = 1(N \times s/C \times m)$$

4.3. Antecedentes en experimentación animal y humana

La interacción de los SMS no sólo se produce con materiales inertes con propiedades diamagnéticas, sino que también hay una gran diversidad de sistemas biológicos capaces de detectar dicho campo y hacer uso de él. Por ejemplo, algunas especies de pájaros, mariposas y tortugas son capaces de servirse del campo magnético terrestre para navegar alrededor de la Tierra gracias a sus propiedades geomagnéticas (Guerra et al, 2014; Johnsen & Lohmann, 2005). Estudios recientes han demostrado la existencia de un sustrato directo a nivel neural relacionado con un sentido magnético en el cerebro de las aves (Wu & Dickman, 2012) y de neuronas magneto sensibles (Vidal-Gadea et al, 2015)

Las primeras descripciones de los efectos biológicos tras la aplicación de los campos magnéticos fueron publicadas en los años 50, donde se observaron cambios en la concentración de leucocitos tras una prolongada exposición a SMS en ratón (Barnothy et al, 1956). Los estudios continuaron en los años sucesivos a diferentes niveles biológicos, confirmando efectos de los SMS aunque sus mecanismos de acción nunca fueron identificados (Azanza & del Moral, 1994; Brewer, 1979; Hong et al, 1988; Young & Gofman, 1965). Más específicamente, los estudios realizados en el SNC describen una influencia directa de los SMS en la actividad neuronal. En un estudio pionero en 1987, Rosen y Lubowsky observaron cambios en la excitabilidad cortical en gatos (Coots et al, 2004; Rosen & Lubowsky, 1987). En concreto, estos autores describieron cómo durante la exposición de un fuerte campo magnético (1200 G) se producía una disminución en la amplitud del pico de los potenciales evocados visuales, así como su variabilidad. Además, observaron que esta inhibición persistía varios minutos tras el fin de la exposición (Coots et al, 2004; Rosen & Lubowsky, 1987). El mismo efecto también fue observado en los potenciales registrados en la médula espinal en cobayas (Coots, Shi e Rosen, 2004), aunque no apreciaron cambios en las latencias. Hay que destacar que en ambos experimentos la amplitud de la respuesta volvía a valores iguales a los de la línea de base en el período de post-exposición.

Aunque existen modelos teóricos que predicen que, como mínimo, es necesario un campo magnético de 24 T para producir las suficientes fuerzas de Lorentz capaces de disminuir la velocidad de conducción axonal (Wikswow & Barach, 1980), a nivel experimental se ha demostrado que tan sólo hacen falta valores de militeslas (200-300 mT). Estos valores mínimos son capaces de modular la excitabilidad de la actividad sináptica en una preparación de rodaja de un hipocampo de ratón (Wieraszko, 2000). La explicación a este fenómeno reside en la influencia de los campos magnéticos en la función de los canales iónicos embebidos en las membranas celulares. Se ha descrito que la activación cinética de los canales de calcio (Rosen, 1996) y de sodio (Rosen, 2003a) se encuentra ralentizada transitoriamente durante la exposición a campos magnéticos estáticos con intensidades moderadas. La hipótesis propuesta para explicar este fenómeno se basa en la propiedad diamagnética anisotrópica de los fosfolípidos de membrana (Rosen, 2003b). En concreto, en presencia de SMS intensos, de al menos algunos Teslas, las moléculas aisladas individualmente se reorientan (Maret & Dransfeld, 1985). No obstante, cuando estas mismas moléculas se encuentran en estructuras biológicas más complejas, presentan una organización sumamente ordenada. Se puede concluir, por tanto, que es la suma de las anisotropías moleculares individuales lo que permite una reorientación bajo un SMS de menor intensidad (Rosen, 2003b). Además, existe una relación inversa entre la excitabilidad de las membranas celulares y el tiempo de exposición al campo magnético (Rosen, 2003b) y una relación directa entre el tiempo de exposición, la intensidad del efecto y el tiempo de recuperación (Aguila et al, 2014).

Respecto a los estudios en humanos, en primer lugar se valoraron los efectos tras la exposición de campos magnéticos de hasta 8 T, sin que se observaran cambios en la ejecución de tareas cognitivas (Chakeres et al, 2003). Estos resultados fueron confirmados bajo la influencia de campos magnéticos no estáticos, donde se sugirió que no se presentaban efectos agudos en las funciones cognitivas, y que estos desaparecen rápidamente tras el fin de la exposición (de Vocht et al, 2006; Kangarlu et al, 1999).

No obstante, en 2011 Oliviero *et al.* describieron la influencia de los SMS sobre M1 y cómo su efecto persistía en el tiempo. Así, una exposición de SMS aplicado sobre M1 durante 10 min produce una disminución de un ~20% en la amplitud de los MEPs (Oliviero et al, 2011). Igualmente, los autores observaron una modulación en el umbral motor de reposo (RMT, sus siglas en inglés), lo que indicaría no solo el efecto sobre los canales de membrana sino también la influencia de los SMS en otros mecanismos plásticos no relacionados con la actividad sináptica intrínseca (Kirimoto et al, 2014). La disminución de la excitabilidad cortical tras la aplicación de tSMS en M1 durante 10 min también se fue descrita en el área cortical S1, con una reducción de la componente N20 en los SEPs (Kirimoto et al, 2014). Esta reducción también fue estimada en un 20% respecto a la línea de base.

4.4. Imanes de tierras raras y sus unidades

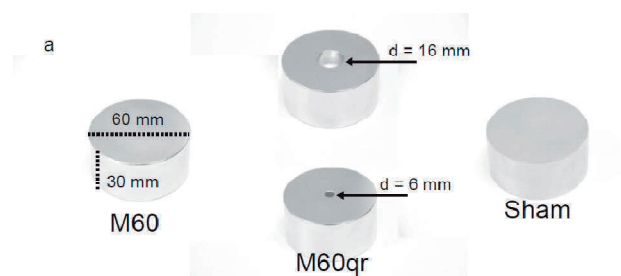
Los primeros imanes de tierras raras se desarrollaron en la década de los años sesenta y fueron realizados con base de samario-cobalto (SmCo_5), los cuales presentaban propiedades magnéticas superlativas en relación con los alnicos y las ferritas, pero que tenían el inconveniente de ser muy costosos. Posteriormente, en 1984 se desarrollaron los imanes de neodimio, realizados por la aleación de neodimio (Nd), hierro (Fe) y boro (B), que se encuentran cristalizados en un sistema cristalino tetragonal ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$). Las tierras raras pertenecen a la familia de los lantánidos y actínidos o los llamados elementos de transición interna.

Las características de los imanes de tierras raras utilizados durante los últimos años en los estudios con SMS se encuentran plasmadas en la **Tabla 4**.

Nombre	Tipo	Diámetro (mm)	Grosor (mm)	Fuerza (kg)
M 30	Real	30	15	225 (23)
M 45	Real	45	30	765 (78)
M 60	Real	60	30	1220 (120)
M 60qr	Real	60	30	1220
MAG 45s	Placebo	45	30	0
MAG 60s	Placebo	60	30	0

Tabla 4 Características de los imanes y los cilindros de acero.
(Rivadulla et al, 2014).

Hay que destacar que, cuando se coloca un imán sobre el cuero cabelludo, la superficie de la corteza se encuentra aproximadamente a 2 cm del centro del imán y, por tanto, la intensidad de campo magnético que recibe el tejido es tan sólo de unos 200-300 mT. En la **Fig. 11** se representa la relación entre la intensidad de fuerza y la distancia de los imanes de diferente talla y forma.



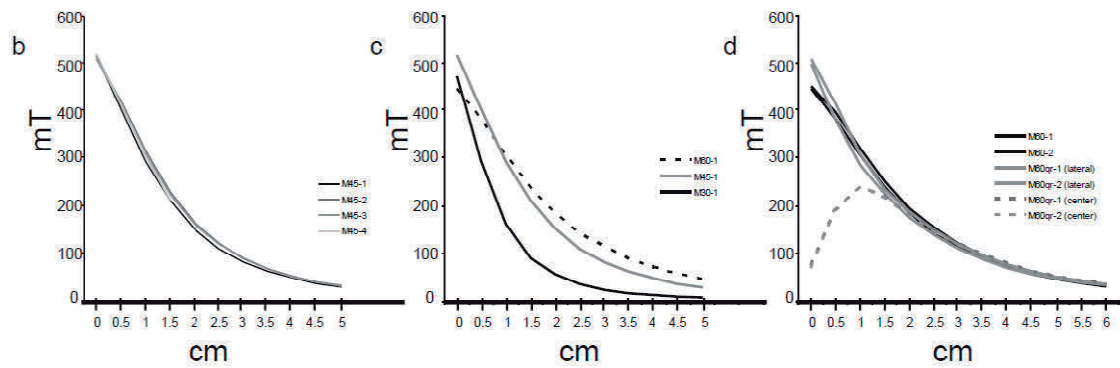


Fig. 11 Diferentes imanes y placebo y la relación entre fuerzas (mT) y distancia (cm).

a) Representación de las dimensiones de los diferentes tipos de imanes y placebo. **b)** La gráfica representa la fuerza en función de la distancia de diferentes imanes M45 medida sobre la superficie de estas, **c)** Representación de la fuerza de tres imanes de diferentes tamaños (M30, M45, M60) en relación con la distancia. **d)** Representación de dos M60 y dos M60 qr (Rivadulla et al, 2014).

Hipótesis y objetivos

Los campos magnéticos estáticos (SMS) son capaces de modificar procesos fisiológicos del sistema nervioso central (SNC) tanto en animales (Aguila et al, 2014; Coots et al, 2004; Rosen, 1993) como en humanos (Gonzalez-Rosa et al, 2015; Kirimoto et al, 2014; Oliviero et al, 2011; Silbert et al, 2013). No obstante, existen dianas en la corteza cerebral donde no se ha estudiado el posible efecto de esta estimulación como, por ejemplo, la corteza parietal.

Así, la hipótesis principal de este estudio se basa en el posible efecto de un SMS aplicado sobre la corteza somatosensorial primaria (S1). En caso de que esta primera hipótesis se viera confirmada, a continuación se procedería a la caracterización de dicho efecto, determinando su alcance funcional a la hora de modificar determinados parámetros fisiológicos. En primer lugar esperamos observar un aumento de la frecuencia alfa tal y como se ha descrito en corteza visual (Gonzalez-Rosa et al, 2015) y, en segundo lugar, una disminución en la amplitud de la componente N20, que es la principal componente asociada con la actividad de S1 (Kirimoto et al, 2014). Además, de estos cambios a nivel electrofisiológico se esperaría que correspondieran con una disminución en la sensibilidad somatosensorial asociada.

Por tanto, los objetivos que hemos establecido para llevar a cabo estas hipótesis son:

Objetivo 1: Estudio de la seguridad de los SMS, que se subdivide en:

- Análisis de marcadores celulares para valorar el posible daño celular asociado a SMS.
- Exámenes cognitivos y tareas motoras para cuantificar las posibles alteraciones cognitivas derivadas de los SMS.

Objetivo 2: Evaluación de los cambios electrofisiológicos mediante la caracterización de las frecuencias de EEG y las componentes N20 y N30 de los SEPs bajo la estimulación de campos magnéticos estáticos.

Objetivo 3: Análisis del cambio sensorial producido por un estímulo repetido presentado a umbral con intensidad constante durante y tras la exposición a un SMS, junto con una valoración de los cambios en los tiempos de reacción ante una posible variación del umbral o un proceso de habituación.

Material y Métodos

5.1. Características generales

La presente investigación tuvo lugar en el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, en los laboratorios del Grupo FENNSI (*Functional Exploration and Neuromodulation of the Nervous System Investigation Group*), cuya línea principal es la neuromodulación con técnicas no invasivas del SNC.

En general todos los experimentos han consistido en aplicación de SMS sobre el área visual y en el área somatosensorial de manera no invasiva, en voluntarios sanos. Los varios estudios han sido observacionales y para cada experimento se detallará el diseño experimental utilizado.

Los sujetos reclutados han sido voluntarios sanos sin ningún tipo de enfermedad hormonal, metabólica, psiquiátrica o neurológica, además de no encontrarse bajo ningún tratamiento farmacológico. Por otro lado, fueron criterios de exclusión tener marcapasos, estimuladores cerebrales, bombas médicas y cualquier objeto metálico incluido en los ojos (a excepción de aparatos dentales), así como de encontrarse en periodo de gestación. Todos los sujetos participantes fueron informados del protocolo y sus posibles efectos adversos, además firmaron el consentimiento informado correspondiente. Igualmente se detallará la cantidad de sujetos que realizaron cada experimento (n) así como su edad por cada protocolo.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Hospitalario de Toledo, llevándose a cabo conforme a la Declaración de Helsinki.

La estimulación con SMS fue producido por un imán cilíndrico de aleación de tierras raras (NdFeB) niquelado. Las dimensiones de dicho imán fueron de 60 mm de diámetro y 30mm de altura y con un peso de 670 g (MAG60r, Neurek SL, España). La fuerza nominal era de 120 kg con una intensidad en la superficie del imán de 0.45 T (Rivadulla et al, 2014). A 2-3cm desde la superficie del imán (distancia aproximada desde la corteza parietal al cuero cabelludo) la fuerza de estimulación magnética fue de 120-200 mT bajo el eje longitudinal del cilindro (Rivadulla et al, 2014). Se ha demostrado que la polaridad de imán no influye en el efecto de la estimulación en corteza motora (Oliviero et al, 2011). No obstante, como las dianas de estimulación de este trabajo difieren de las de otros estudios hasta ahora descritos en la literatura, hemos mantenido siempre la misma polaridad en todos los experimentos de un mismo protocolo. Por otro lado, la condición placebo se llevó a cabo utilizando un cilindro no magnético de acero, de las mismas dimensiones y peso que el imán. Además, este cilindro se presentó un baño de níquel para tener la misma apariencia externa que el imán utilizado para la estimulación.

En este trabajo se especificará en cada apartado de material y métodos cuál ha sido el análisis estadístico utilizado en cada caso. Todos ellos fueron realizados con el software *Statistica*. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar (SD) o media \pm intervalo de confianza (CI), según se indique en cada caso

5.2. Experimento 1: Estudio de seguridad de la aplicación transcraneal de campos magnéticos estáticos (tSMS) en corteza cerebral en humanos

El experimento 1 tiene como objetivo determinar la seguridad de la exposición prologada (2 h) a un campo magnético. Esta duración se eligió en base a posibles tratamientos futuros con SMS, ya que el efecto de este tipo de estimulación se relaciona con los efectos acumulativos derivados del tiempo de exposición (Aguila et al, 2014). La polaridad fue la misma para todos los sujetos y constante (polaridad norte).

A lo largo del experimento se realizaron tres conjuntos de pruebas para valorar a diferentes niveles sistémicos los posibles efectos de la exposición a SMS. En primer lugar, a nivel molecular se realizaron análisis de sangre para estudiarlos biomarcadores S100 β y enolasa específica neuronal (NSE). Estas proteínas son marcadores sensibles a la activación glial y al daño neuronal, respectivamente, y el aumento de sus niveles en sangre se utiliza como un indicador fiable de diversos tipos de lesión cerebral como la isquemia, el edema cerebral o con alteraciones en la barrera hemato-encefálica (Yardan et al, 2009). Además, el aumento de estas concentraciones se ha relacionado con enfermedades cerebro-vasculares (Herrmann et al, 2000; Schaarschmidt et al, 1994) y otros desórdenes del SNC (Kaiser et al, 1989; Rothermundt et al, 2003). En segundo lugar, para determinar posibles cambios a nivel motor se ejecutaron dos tests de coordinación visual-motora. Por último, se valoró a nivel cognitivo la influencia de la exposición a SMS mediante dos tests neuropsicológicos. Los procesos cognitivos son considerados fundamentalmente dependientes del lóbulo frontal, no obstante se quería evaluar la función cognitiva asociada a una localización diferente al área estimulada (Calamia et al, 2012) (ver apartado 5.2.2 para más detalles).

5.2.1. Sujetos

En el experimento participaron 17 voluntarios sanos (10 hombres de 34.4 años; SD 7.3) con un rango de edad entre 24 y 45 años. Todos los sujetos menos uno fueron diestros.

5.2.2. Experimental set-up

La corteza occipital fue la diana de estimulación con SMS, más concretamente sobre la localización Oz en el SI 10/20 de EEG. La estimulación transcraneal tuvo una duración total de dos horas. El imán se colocó sobre la diana con un sistema de correas de cuero (MAGlet60+, Neurek SL, España), permitiendo una adaptación perfecta a la anatomía

de cada sujeto. Un cilindro de las mismas dimensiones y peso similar (670g) no magnético fue añadido a nivel frontal para proporcionar un contrapeso al imán y poder mantener fija la posición (**Fig. 12**).



Fig. 12 Representación de la colocación del tSMS en la corteza visual

La tSMS se coloca a nivel occipital (Oz), mientras que a nivel frontal se posiciona un dispositivo no ferromagnético como contrapeso. Se utiliza un sistema de correas de cuero para ajustar individualmente la posición de ambos dispositivos (Oliviero et al, 2014).

Los sujetos estuvieron en posición de sedestación en una silla de ruedas durante todo el experimento y fueron transportados de una habitación a otra. Los estudios cognitivos fueron realizados en un despacho aislado, donde sólo se encontraban presentes el sujeto y la neuropsicóloga, con el fin de evitar cualquier tipo de elemento distractor. Sin embargo, la extracción de sangre y los tests visual-motores se realizaron en una habitación luminosa y común.

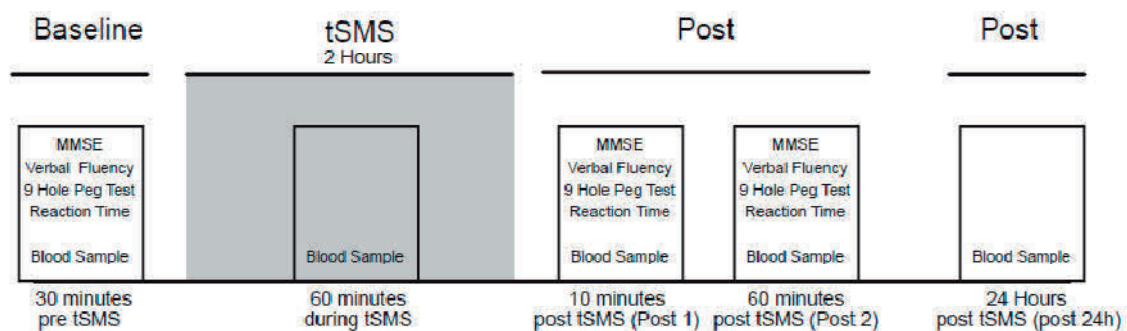


Fig. 13 Diseño del protocolo experimental del Experimento 1

El protocolo constó de 5 mediciones, con una exposición a la tSMS de 2 h y una duración total del experimento de 24 h. Las mediciones se dividieron en test cognitivos (MMSE y test de fluidez verbal), test motores (NHPT y tiempo de reacción) y análisis de marcadores de daño neuronal (análisis de sangre)

El Exp. 1 constó de 5 mediciones a lo largo de 24 h de las cuales sólo dos horas correspondieron con una estimulación transcranial con SMS. La primera medición (pre-tSMS) se realizó 30 min antes de la estimulación, a los 60 min del comienzo de la tSMS se llevó a cabo la segunda medición (durante tSMS). A la finalización de la estimulación con SMS (2 h) se produjo la tercera medición (post1) y tras una pausa de 60 min se realizó la cuarta (post2). La última y quinta valoración se realizó 24 h después del inicio del experimento (post 24 h; **Fig. 13**).

Un catéter periférico fue colocado en la fosa cubital izquierda y mantenido durante todo el experimento para la extracción de la sangre. No obstante, el catéter fue quitado para la última extracción, post 24 h, la cual fue obtenida con una nueva vía. La extracción se realizó gracias a la ayuda de personal técnico especializado del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Tras 1 h a temperatura ambiente, las muestras fueron almacenadas durante 3 h a 4 °C para inducir coagulación y posteriormente el suero fue obtenido por una centrifugación lenta (800×g) y lavado por una centrifugación media (5000×g). Las alícuotas fueron preservadas a -20°C hasta ser usadas. Las mediciones del suero NSE y S100β fueron realizadas usando Quantrikine® ELISA kit (Millipore). En ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante.

Las pruebas neurofisiológicas fueron realizadas por una experta la neuropsicóloga con el fin de estudiar posibles alteraciones cognitivas asociadas a la estimulación magnética. La primera de las pruebas fue el Mini Examen del Estado Mental o, en inglés, *Mini-mental Status Examination* (MMSE) (Folstein et al, 1975). El MMSE consta de 30 preguntas donde se evalúan distintos parámetros tales como la orientación espacio-temporal, la concentración, la memoria, la atención, el cálculo, el lenguaje, la percepción viso-espacial y, por último, el seguimiento de instrucciones básicas. Dicho test se realizó en un tiempo aproximado de 5-10 min. La segunda prueba consistió en un test de fonética y fluidez verbal (Calamia et al, 2012), donde se solicitó a los sujetos enunciar la máxima cantidad de palabras posibles iniciadas con las letras *F*, *A* o *S* en 60 s. Estas palabras no podían ser nombres propios ni tampoco derivados de número (plurales), de género (masculino/femenino) o diminutivos. El orden de la presentación de las letras para cada sujeto fue aleatorio a lo largo del experimento.

Para examinar a nivel motor los posibles efectos de la estimulación transcraneal se realizaron dos exámenes. Con el primer test, llamado en inglés *Nine hole peg test* (NHPT), se evaluaron las habilidades motoras finas (Mathiowetz et al, 1985) midiendo el tiempo necesario para insertar 9 bastones (uno por uno) en un panel con 9 agujeros y recogerlos posteriormente. En condiciones normales la tarea se debe realizar tres veces con cada mano (Mathiowetz et al, 1985) aunque, debido a la presencia del catéter, sólo se realizó con aquella mano que no lo tenía. El segundo test realizado valoró la coordinación visual-motor de tipo complejo. La tarea consistió en elegir entre dos opciones que se presentaron en una pantalla de ordenador. Así, el sujeto debía presionar la tecla correspondiente con el sentido de la flecha (izquierda o derecha) de la manera más rápida y correcta posible. El test constó de tres bloques, cada uno de 120 ensayos. En este caso, la tarea se realizó con ambas manos.

5.2.3. Análisis datos

5.2.3.1. Muestras de sangre

Se midieron las concentraciones en suero de NSE y S100 β en sangre para cada periodo. Se comparó si presentaban cambios de concentración a lo largo del tiempo mediante un *t-test* de muestras pareadas.

5.2.3.2. Tests cognitivos

En primer lugar se evaluó el MMSE, cuya puntuación máxima es de 30 puntos. El test se basa en el número de respuestas correctas en su totalidad. Según el número de respuestas correctas se puede evaluar el nivel de deterioro cognitivo (puntuaciones de referencia: ≥ 27 , normal; ≤ 24 , sospecha patológica; 12-24, deterioro; 9-12, demencia) (Vertesi et al, 2001). La puntuación del test se comparó a lo largo del experimento. De igual modo, se realizó el análisis del segundo test cognitivo, el test de fluidez verbal. Se comparó el número de palabras enumeradas por cada letra y el número de palabras en todos los tiempos del experimento. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía (Tiempo) de medidas repetidas.

5.2.3.3. Tareas motoras

Las tareas motoras se cuantificaron como tiempo de reacción (RT) en segundos (s). En el NHPT se calculó el tiempo total invertido en la realización de la tarea (coger el primer bastón hasta depositar el último bastón). Si la tarea no pudo ser completada por la caída de un bastón u otra causa, se le dio un valor total de 300 s a ese ensayo, realizándose un total de tres ensayos, los cuales finalmente se promediaron. Los datos fueron analizados con un *t-test* para muestras pareadas. Respecto a la tarea óculo-motora, además de analizar el RT, se midió la precisión de la respuesta, es decir, la cantidad de errores por cada ensayo. Asimismo, este test también se repitió tres veces con 120 estímulos cada uno, promediando los valores de los tres bloques. En este caso los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías (Tiempo y Mano) de medidas repetidas.

5.3. Experimento 2: Estudio neurofisiológico de la influencia de un campo magnético estático sobre corteza sensorial primaria (S1) izquierda

Los voluntarios reclutados fueron expuestos a un campo magnético estático con polaridad norte aplicado sobre S1 izquierda mientras se registró su actividad cerebral mediante un EEG. Además de su actividad espontánea, también se registró la actividad evocada mediante la estimulación eléctrica en el nervio mediano derecho.

5.3.1. Sujetos

Se reclutaron 17 sujetos voluntarios (11 hombres, 17 diestros, con una media de edad 30.17 años; SD 5.92). Cada sujeto concluyó las dos condiciones experimentales (real y placebo) en un diseño de doble ciego *cross-over*. Entre las dos sesiones experimentales transcurrió al menos una semana (tiempo de lavado). No obstante, siempre se mantuvo el mismo rango horario (mañana o tarde) para las sesiones de cada sujeto. Las condiciones experimentales (real/placebo) fueron aleatorizadas para cada uno de los sujetos. Los sujetos fueron instruidos para no hablar y no moverse, a no ser que se produjese algún problema, y así evitar los ruidos en el registro del EEG. Los sujetos no fueron capaces de reconocer si la estimulación que se le aplicaba era real o placebo (Respuestas correctas 42.4%, *Pearson chi-squared*=0.8, $p=0.37$)

5.3.2. Diseño experimental

La sesión experimental duró un total de 46 min y se dividió en 5 periodos: ojos abiertos (180 s), ojos cerrados (180 s), línea de base (10 min), intervención (20 min) y post-intervención (10 min). En primer lugar, se inició el registro en estado de reposo durante 180 s con los ojos abiertos, seguido con 180 s con los ojos cerrados. A continuación se registraron 3 bloques más con ojos abiertos al mismo tiempo que se estimuló eléctricamente el nervio mediano con una frecuencia de 3 Hz: línea de base (10 min), intervención (20 min) y post-intervención (10 min). La estimulación eléctrica evocó potenciales somatosensoriales (SEPs, sus siglas en inglés) en bloques de 240 s. Entre cada bloque de estimulación existió un periodo de descanso de 120 s.

El registro de EEG fue realizado de forma continua y monopolar, con 3 electrodos de Ag/AgCl, que fueron colocados en las posiciones C3', C4' (3 cm posterior a C3 Y C4) y en F3 de acuerdo con el SI 10/20 EEG. La referencia de los electrodos fue situada en el lóbulo de la oreja derecha con un electrodo de cucharilla (utilizando pasta conductora Ten 20 (*Weaver and Company*, EEUU)), mientras que la tierra fue colocada en el mismo gorro en la posición Fpz (**Fig. 14**).

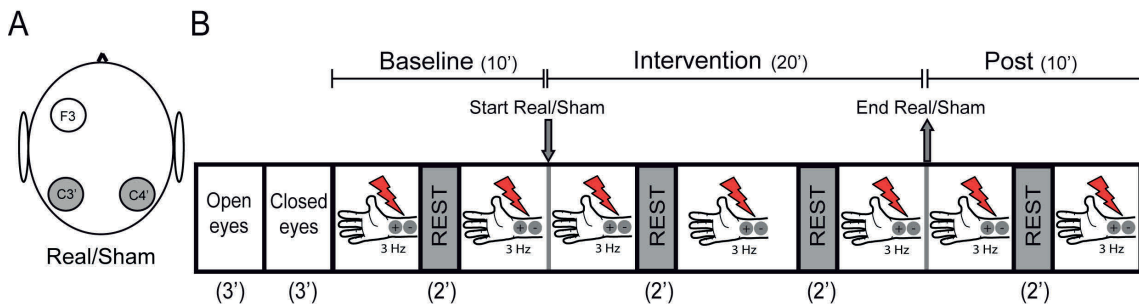


Fig. 14 Diseño experimental del Exp. 2.

A) Montaje de los electrodos de registro según el SI 10/20. Dos electrodos correspondieron a ambas cortezas S1 (C3' y C4') y un tercer electrodo fue colocado a nivel frontal (F3). **B)** El protocolo experimental se dividió en 5 bloques, dos de reposo (ojos abiertos y ojos cerrados) y tres con estimulación eléctrica sobre el nervio mediano en bloques de 240 s y 120s de pausa (línea de base, intervención y post-intervención).

La impedancia de los electrodos fue mantenida por debajo de los $5K\Omega$ durante toda la sesión experimental. Además, se colocó entre el gorro de EEG y los cilindros (no ferromagnéticos y/o imán) un plástico para evitar el posible efecto antena que pudiera producir el contacto entre el gel y los dispositivos metálicos durante el registro. Dos canales extras de electromiograma (EMG) fueron colocados con 4 electrodos de pegatinas. El primer canal situado en el músculo adductor del pulgar derecho (electrodo activo sobre el vientre muscular y la referencia sobre falange distal) correspondió con el potencial producido por la estimulación eléctrica del nervio mediano. El segundo canal, emplazado en la fosa subclavicular derecha registró el potencial Erb (electrodo activo fosa subclavicular y el activo en la clavicular), correspondiente con la entrada en la médula del potencial evocado por la estimulación eléctrica periférica.

El EEG y EMG fueron registrados con una frecuencia de muestreo de 2048 Hz y procesados posteriormente con un filtro pasa alto de 0.16 Hz. Las señales de EEG y EMG se adquirieron con un equipo de EEG (System Plus Software, SAM 32, MicroMed, Italy). Se estimuló el nervio mediano derecho con un pulso cuadrado de 0.2 μ s (Digitimer DR7 4; Cambridge Electrónica, UK). Los estímulos eléctricos fueron evocados con un electrodo bipolar (ánodo posición distal y cátodo posición proximal), ajustando la intensidad al umbral motor del adductor derecho del pulgar de manera personalizada para cada sesión de cada voluntario y manteniéndolo constante durante todo el experimento. La media de la intensidad eléctrica del estímulo en el grupo real fue 7.78 mA (SD 0.16), mientras que en el grupo placebo fue 7.33 mA (SD 0.16), no observándose diferencias entre ambos (*t-test* muestras pareadas $p > 0.05$).

5.3.3. Análisis de datos

Todos los datos fueron analizados utilizando Matlab (MathWorks, EEUU). Los segmentos con artefactos tanto musculares como eléctricos fueron excluidos tras una inspección visual del registro.

5.3.3.1. Análisis de frecuencia

La derivación de EEG utilizada para el análisis de frecuencia fue el canal C3'C4'. Las bandas de frecuencia examinadas en este estudio fueron la banda α , la banda β y la banda γ . El rango de las frecuencias estudiadas fue el mismo que realizó Linkenkaer-Hansen *et al.*, banda α (8-12 Hz) y la banda β (15-29 Hz) (Linkenkaer-Hansen *et al.*, 2004). La PSD fue estimada usando el método *Welch* (periodograma enventanado, segmentado y promediado) con ventana *hamming* de 1s, sin solape y con una resolución de frecuencia de 0.5 Hz. El resultado relativo a los espectros de frecuencia de EEG para cada banda fue calculado cada minuto (46 min totales) y, posteriormente, colapsados cada 120 s en los bloques de línea de base, intervención y post-intervención. En cambio, en los casos de ojos abiertos y ojos cerrados se realizó un promedio de 180 s para cada uno.

En primer lugar, el análisis de la banda α se realizó calculando de forma individual la frecuencia de alfa (IAF, sus siglas en inglés), y promediando la amplitud espectral $IAF \pm 2$ Hz (Klimesch, 1999). El espectro estimado de la potencia relativa en la banda alfa durante los tiempos intervención ($Relative_bandPower(i_{intervención})$) y post-intervención ($Relative_bandPower(i_{post})$) en el canal i fue obtenido sustrayendo de cada sujeto la transformación logarítmica de la potencia de la banda alfa durante el periodo de la línea de base (min 7-8) ($Pow_{i, \text{línea de base}}$) a la transformación logarítmica de la potencia de la banda alfa durante la intervención ($Pow_{i, \text{intervención}}$), y post-intervención ($Pow_{i, \text{post}}$), de acuerdo con la fórmula:

$$\begin{aligned} Relative_bandPower(i_{intervención}) &= \text{Log}(Pow_{i, \text{intervención}}) - \text{Log}(Pow_{i, \text{línea de base}}) \\ Relative_bandPower(i_{post}) &= \text{Log}(Pow_{i, \text{post}}) - \text{Log}(Pow_{i, \text{línea de base}}) \end{aligned}$$

El análisis de ojos abiertos y ojos cerrados sirvió para verificar el pico de alfa en aquellos sujetos donde el pico no estaba bien delimitado.

En segundo lugar, se calculó la densidad espectral de potencia para las frecuencias correspondientes con la banda de la frecuencia β

5.3.3.2. Potenciales somatosensoriales (SEPs)

Los potenciales evocados asociados a la estimulación eléctrica del nervio mediano se obtuvieron de el canal C3'C4'. Las respuestas se promediaron en bloques de 300 s y posteriormente se midieron las amplitudes y las latencias de los picos P19, N20, P25, N30 y P40 en los potenciales de ambos canales, para posteriormente calcular el pico-pico entre las componentes P19-N20 (componente N20), N20-P25 (componente P25), P25-N30 (componente N30). La localización de los picos se llevó a cabo de una manera

ordenada: primero se localizó el pico N20 y a partir de esta referencia se determinaron los demás. No obstante, en aquellos casos que este criterio no terminaba de ser determinante para localizar los demás picos, se realizó una segunda verificación comparando la diferencia de la latencia de los picos en N30 en el canal C3'C4'.

5.3.3.3. Oscilaciones de alta frecuencia (HFO)

Los SEPs contienen una oscilación de alta frecuencia asociada alrededor de 600Hz que se encuentra superimpuesta a la inicial componente cortical (N20) (Cracco & Cracco, 1976; Curio et al, 1994; Hashimoto et al, 1996).

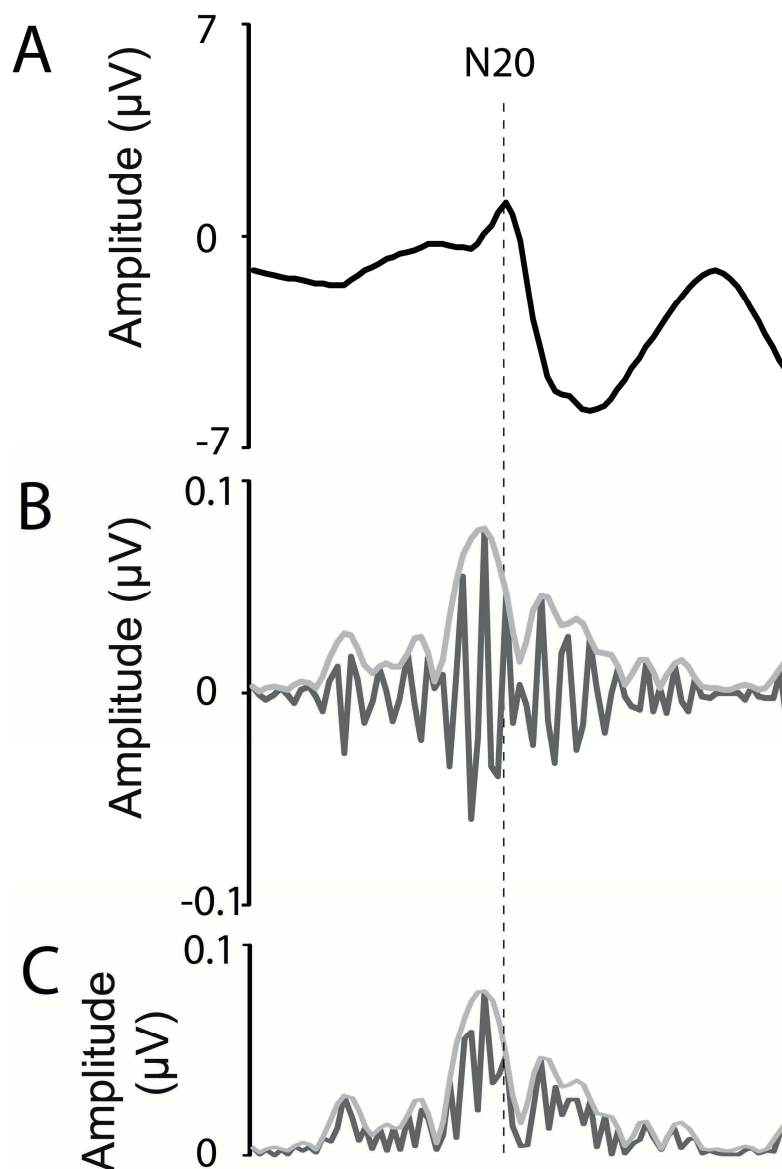


Fig. 15 Ejemplo representativo del procesamiento de la señal de EEG para la obtención de las HFO en un sujeto **A)** Ilustración de un SEP tras realizar la interpolación cúbica para la eliminación del artefacto eléctrico **B)** Aplicación de un filtro pasa banda (500-1000 HZ) para la obtención de las HFO asociadas a los potenciales. **C)** Rectificación de la señal HFO. La línea gris en la figura B y C es la envolvente de la señal.

Para poder valorar las HFO es necesario un pre-procesamiento de la señal en el canal C3'F3, el cual consistió en primer lugar en la eliminación de los artefactos de estímulo eléctrico usando una interpolación cúbica (5 ms antes del estímulo y 2 ms después del estímulo). A continuación, se filtró la señal con un paso de banda de 500-1000 Hz y, en último lugar, se realizó el promedio de los potenciales (Waterstraat et al, 2015) (**Fig. 15**).

El método empleado para comprobar la reproducibilidad de la señal y, por tanto, verificar que la HFO no fuese ruido consistió en la división de la señal de la línea de base en tres promedio separados (cada uno de 200 s) y en su superposición en una misma gráfica (**Fig. 16**). Gracias a esta representación se determinó con qué latencia se inicia (*onset point*) y finaliza (*offset point*) la reproducibilidad de la onda (Katayama et al, 2010) (Fig. 16), que consiste en el rango donde las oscilaciones son sincrónicas. Los valores de latencia inicial y final fueron obtenidos individualmente para cada una de las sesiones de cada sujeto, así como la determinación de la N20. El rango de *onset point* hasta la N20 representa la *early wave*, mientras que el periodo entre la N20 y el *offset point* corresponde a la *late wave*. Los valores de la amplitud de la *early wave* y de la *late wave* fueron analizados por separado ya que el origen de cada onda está asociado a poblaciones neuronales diferentes.

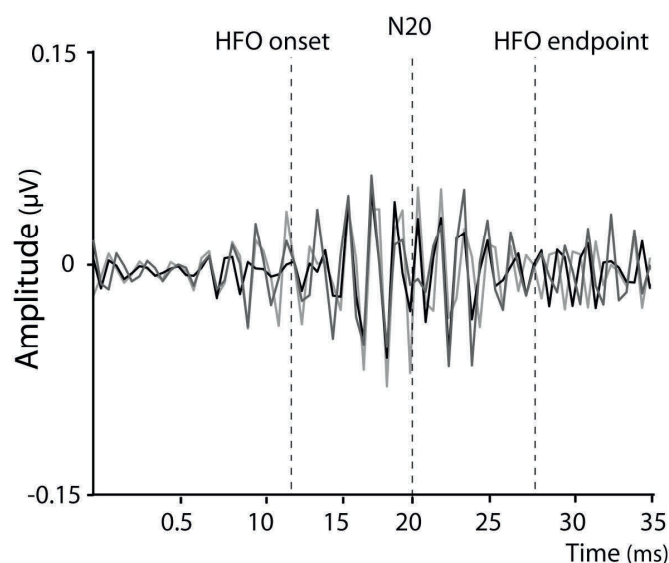


Fig. 16 Ejemplo de la sincronización de HFO en un sujeto representativo
La señal de EEG durante la línea de base se dividió en tres bloques de 200 s y se superpuso. Se encuentra marcada la componente N20 y los puntos donde comienza la sincronización (HFO *onset*) y donde termina (HFO *end point*).

5.3.3.4. Potenciales ERB y MEP

Los ERB y MEP fueron promediados en bloques de 600 s para su análisis y se calculó la amplitud pico-pico.

5.4. Exp. 3: Estudio de la influencia de un campo magnético estático sobre corteza sensorial primaria izquierda (S1) ante un estímulo eléctrico en el dedo índice derecho.

El Exp. 3 fue desarrollado para evaluar los efectos en el comportamiento sensorial durante y tras la exposición a un SMS. Más concretamente, la zona estimulada fue la S1 izquierda. La localización exacta correspondiente a la zona estimulada (el dedo índice derecho) se determinó mediante la medición de las posiciones Cz (centro de la cabeza), C3 (6 cm lateral a Cz) y C3' (3 cm posterior a C3) correspondientes al SI 10/20 EEG. Estas posiciones fueron medidas una a una para cada sujeto y marcadas en un gorro de piscina colocado con anterioridad. La aplicación de la tSMS se realizó en C3' y, para asegurar que el punto estimulación fue constante a lo largo de todo el experimento, el gorro no se retiró hasta el final de la sesión. La posición de los voluntarios es igual que en el Exp. 2.

Este experimento se realizó con un diseño de doble ciego placebo-real. Las condiciones experimentales fueron asignadas aleatoriamente para cada grupo. No se encontraron diferencias entre los grupos real y placebo en cuanto a sexo y edad. Al final del experimento los sujetos fueron interrogados sobre si sabían el tipo de estimulación al que fueron sometidos (real o placebo), sin que fueran capaces de reconocer a qué tipo de estimulación fueron expuestos (Respuestas correctas 59.0%, *Pearson chi-squared*=1.7, $p=0.19$). La polaridad del campo magnético fue sur para todos los sujetos.

5.4.1. Sujetos

El total de voluntarios reclutados que realizaron la tarea fue de 50 sujetos diestros (29 mujeres, edad media, 32.46 años; SD, 8.35). Sin embargo, tres sujetos no terminaron el experimento y fueron excluidos del análisis. Durante la realización del experimento los sujetos se encontraron tumbados boca arriba con los ojos abiertos en una camilla en una habitación con las luces apagadas y la temperatura constante. Se colocaron dos cilindros metálicos en la corteza parietal derecha (C4') e izquierda (C3') para asegurar la simetría del *set-up*, así como una posición cómoda para los sujetos. Los voluntarios fueron instruidos para no moverse y permanecer concentrados en la tarea a lo largo de toda la sesión experimental.

5.4.2. Diseño experimental

La sesión experimental consta de una duración de 30 min, dividida en tres bloques de 10 min cada uno (línea de base, intervención (real/placebo) y post-intervención), siendo estimulado eléctricamente el dedo índice derecho de los voluntarios (**Fig. 17**).

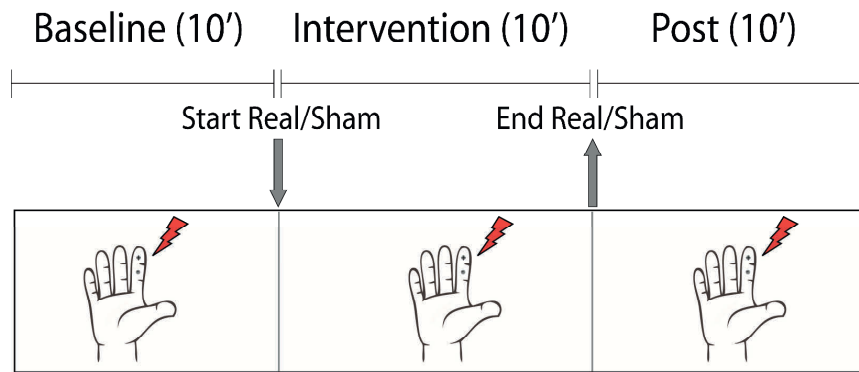


Fig. 17 Diseño del protocolo experimental del Exp. 3.

La tarea se dividió en tres bloques de 10 min con una exposición a tSMS de 10 min. Los sujetos debían detectar la estimulación eléctrica evocada de forma aleatorizada en el dedo índice de la mano derecha.

Se colocaron electrodos adhesivos en la falange distal del dedo índice derecho donde se evocó un pulso eléctrico. En cada bloque hubo un total de 200 ± 6 estímulos eléctricos. Cada estímulo fue evocado de manera aleatoria con cada 3 ± 1.5 s de media (Monto et al, 2008). La duración del estímulo eléctrico de pulso cuadrado fue de 200 μ s. La intensidad de corriente eléctrica fue ajustada para cada sujeto respecto a su propio umbral de sensibilidad ($\sim 50\%$ de los ensayos detectados) antes de comenzar el experimento. Una vez determinada la intensidad adecuada, ésta permaneció fija durante toda la sesión experimental. La media de la intensidad del estímulo fue de 2.60 mA (SD, 1.3) en el grupo real y 2.56 mA (SD, 1.01) en el grupo placebo, sin que se encontraran diferencias entre ambos grupos (*t-test* no pareado; $p = 0.91$).

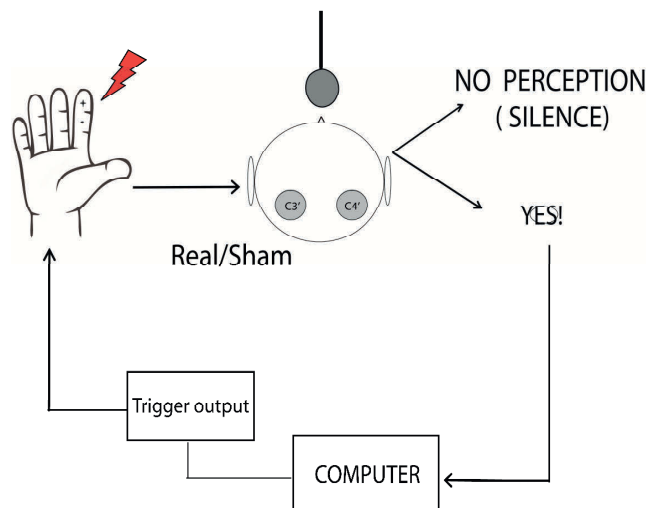


Fig. 18 Representación de la colocación del sujeto, la tSMS y a estimulación eléctrica en el Exp.3.

El sujeto respondía ante un micrófono cuando percibía la estimulación eléctrica en el dedo derecho, en caso contrario permanecía en silencio. La tSMS o estimulación placebo se colocó en la corteza S1 contralateral.

La tarea consistió en decir "Sí" en un micrófono cada vez que el sujeto sintiese el estímulo eléctrico en el dedo índice derecho y en permanecer en silencio el resto del tiempo (**Fig. 18**). Las respuestas de los sujetos fueron registradas por el software Spike2 7.12 (Cambridge Electrónica, UK), mientras que la estimulación eléctrica se realizó con el estimulador eléctrico Digitimer DR7 4 (Cambridge Electrónica, UK).

En el Exp. 3 se analizó por un lado la probabilidad de respuesta (PD), es decir, la cantidad de respuestas a estímulos eléctricos detectadas en un minuto y, por otro, el tiempo de reacción (RT) o tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y su detección.

5.4.3. Análisis de datos

La clasificación de las respuestas utilizadas para el análisis de datos se basó en aquellas comprendidas en el rango entre 0.1-1.5 s tras el estímulo eléctrico. Las respuestas dentro de este intervalo fueron consideradas positivas. La ausencia de respuesta fue clasificada como negativa y las respuestas fuera del rango de 0.1-1.5 s fueron consideradas como *miss-trial*. Los sujetos que presentaron más de un 3% de *miss-trial* durante el experimento fueron considerados como falsos positivos y por tanto excluidos del análisis final (2 sujetos; **Fig. 19**).

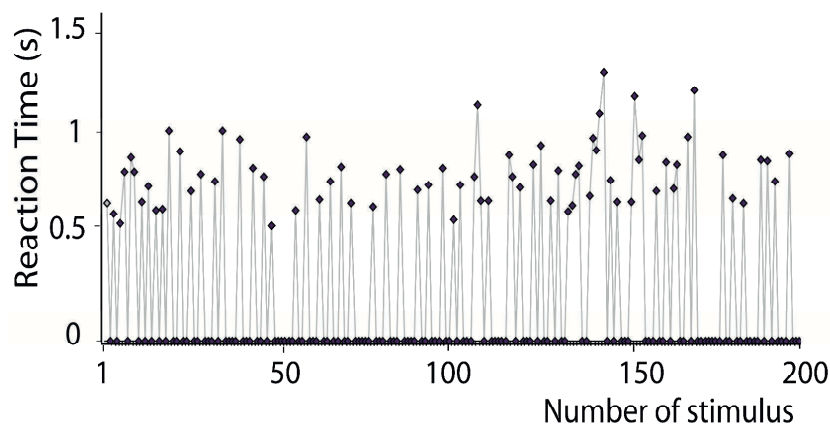


Fig. 19 Representación del total de "Sí" y "Silencio" a lo largo de un bloque experimental. El eje y corresponde al tiempo de reacción (s) y el eje x corresponde al número total de estímulos evocados en los 10 min de línea de base de un sujeto representativo.

5.4.3.1. Análisis de Probabilidad de Respuesta (PR)

En periodos de un minuto se contabilizaron el número de respuestas positivas y negativas. Para calcular la PR, las respuestas negativas (silencio) y positivas (Sí) fueron codificadas con un cero y con un uno, respectivamente.

5.4.3.2. Análisis de Tiempo de Reacción (RT)

En este caso, también se promediaron minuto por minuto las respuestas negativas (codificadas con un cero) y las positivas (codificadas como el intervalo temporal en ms). Las respuestas negativas no fueron incluidas en el análisis.

Para el análisis final se realizó una correlación entre el PD y su propia SD en la línea de base (colapsado en un único tiempo) para comprobar su distribución. Esta representación fue utilizada para determinar el criterio de exclusión basado en el rango óptimo de respuestas. Este rango se definió entre el 20-80% de las respuestas positivas. Por un lado, menos del 20% fue considerado como sub-umbral teniendo como consecuencia un "efecto suelo", mientras que, por lo contrario, más del 80% fue considerado como supra-umbral "efecto techo" (**Fig. 20**). Tres sujetos fueron excluidos al no cumplir estos criterios.

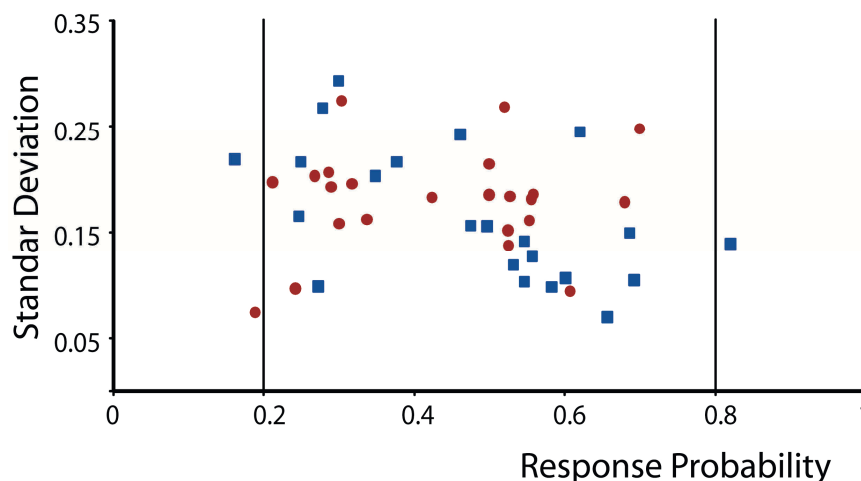


Fig. 20 Criterio de exclusión en el análisis final en el Exp.3. Representación del porcentaje de respuesta (eje x) VS su propia SD (eje y) durante la línea de base de todos los participantes. Los sujetos que no se encontraban en el rango entre un 20-80% de detección de estímulo fueron excluidos del análisis final (3 sujetos).

Finalmente, un total de 42 voluntarios (12 mujeres media de edad 29.63 años, SD 5.8 grupo placebo; 15 mujeres media de edad 33.4 años, SD 11.46 grupo real) fueron introducidos en el análisis estadístico, no observándose diferencias estadísticas entre ambos grupos (*t-test* para muestras no pareadas; $p = 0.14$).

Resultados

6.1. Experimento 1: Estudio de seguridad de la aplicación transcraneal de campos magnéticos estáticos sobre la corteza cerebral humana.

En el presente estudio se evaluaron los posibles efectos adversos a nivel celular y cognitivo, asociados a una larga exposición (2h) a tSMS. La sesión fue bien tolerada por los 17 sujetos que participaron en ella y sólo uno de ellos indicó dolor de cabeza y entumecimiento al final de la sesión.

6.1.1. Valoración bioquímica de indicadores de daño celular

Tras la extracción de sangre se analizaron las concentraciones de NSE y S100 β , indicadores utilizados en clínica como factor predictor de daño cerebral (Böhmer et al, 2011; Dworschak et al, 2003; Missler et al, 1997), y además usados como medida de seguridad en otros protocolos de NIBS (Chaieb et al, 2014; Nitsche et al, 2003b).

En primer lugar, el análisis de las muestras de sangre reveló que la concentración de NSE fue constante a lo largo de toda la sesión experimental (*t-test* de muestras pareadas: periodo de estimulación $p=0.74$, $n=16$; Post1 $p=0.92$, $n=15$; Post24 h $p=0.92$, $n=13$; línea de base: 4.75, SD 3.12ng/ml VS post2: 4.79, SD 2.14 ng/ml; *t-test* de muestras pareadas post2 $p=0.98$, $n=15$; **Fig. 21**).

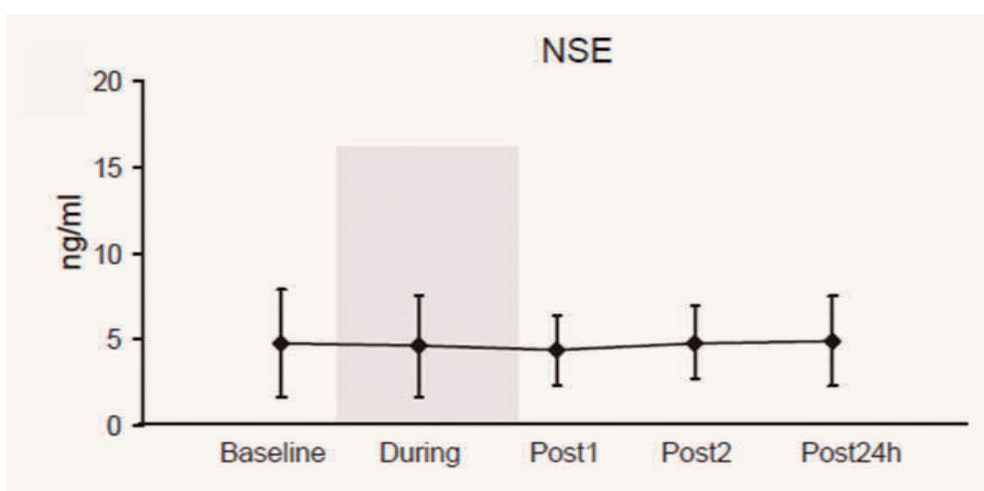


Fig. 21 Curso temporal de la concentración de NSE.

No se observan cambios en la concentración de este marcador de daño neuronal a lo largo de tiempo. La exposición de dos horas a un SMS no influyó sobre la concentración de NSE. Las barras de error corresponden con la SD.

En segundo lugar, la concentración del marcador de daño astrogial S100 β tampoco se incrementó tras la exposición al tSMS. Al contrario, los niveles de S100 β disminuyeron en todos los tiempos excepto en el post24h (*t-test* para muestras pareadas: durante estimulación $p=0.00014$, $n=14$; post1 $p=0.0166$, $n=15$; post2 $p=0.00083$, $n=17$; post 24h, $p=0.33$, $n=13$). De la misma manera que en el caso de NSE, el análisis detallado

del tiempo post2 demostró una disminución de la concentración de S100 β (línea de base: 14.11, SD 8.54; post2 9.98, SD 7.05) no sólo con el análisis mediante un *t-test* de muestras pareadas teniendo en cuenta dos tiempos cada vez, sino con un test estadístico más conservador que comprendió el curso temporal completo (ANOVA de una vía; Tiempo $F(2,32)=7.9$, $p>0.05$; **Fig. 22**).

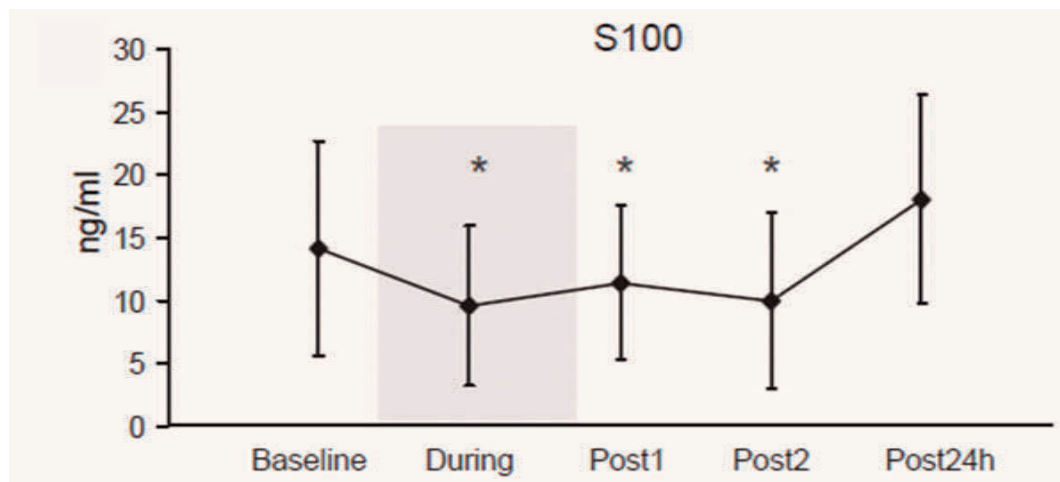


Fig. 22 Curso temporal de la concentración S100 β .

La concentración de los niveles de suero S100 β disminuyó durante la exposición a la tSMS y en los tiempos Post1 y Post2. No obstante, la concentración volvió a los valores de la línea de base tras 24 h (*= $p < 0.05$). Las barras de error representan la SD.

6.1.2. Tests cognitivos

El primer test cognitivo (MMSE) evaluó las posibles alteraciones cognitivas asociadas a los tSMS. Para su análisis cuantitativo se promedió el número de respuestas positivas del total del cuestionario (máximo: 30 puntos). No se observó cambio alguno en la valoración del MMSE antes y después de la estimulación de los sujetos (*t-test* de muestras pareadas: línea de base =29.3, SD 1.1; post1=29.6, SD 0.6; post2=29.6, SD 0.8; $p>0.33$).

En el segundo test cognitivo se valoró el impacto de la estimulación magnética en la fluidez verbal de los sujetos. Para ello, se midió el máximo número de palabras que comienzan por una determinada letra (A, S o F) que los sujetos fueron capaces de enumerar en un minuto. Interesantemente, se observó una mejora en la fluidez verbal en los tiempos inmediatamente posteriores a la estimulación (*t-test* de muestras pareadas; post1 $p=0.0091$; post2 $p=0.0026$). Además, los datos fueron reanalizados con un test estadístico más conservador, confirmando el resultado precedente (ANOVA de una vía, Tiempo $F(2,32)= 7.9$, $p=0.0016$). Esta mejora en la realización de la tarea probablemente fue debida a un efecto de aprendizaje ya que el test se repitió cuatro veces en 3.5 h (**Fig. 23**).

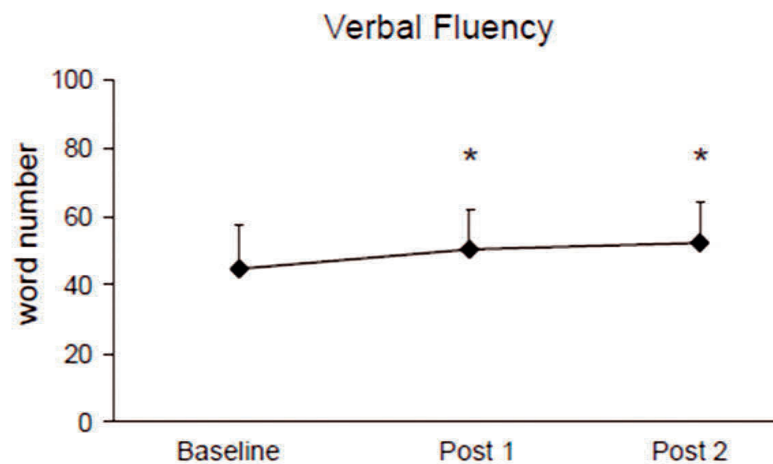


Fig. 23 Curso temporal la fluidez verbal.

Representación del número total de palabras enumeradas en un minuto que comienzan por las letras A, S o F. Se observó un aumento en el número de palabras citadas tras la estimulación, posiblemente debido a un proceso de aprendizaje (*= $p < 0.05$). Las barras de error representan la SD.

6.1.3. Tiempo de Reacción (RT)

El tiempo de reacción en la tarea óculo-motora se calculó como el intervalo de tiempo que los sujetos tardan en realizar una elección ante la aparición de un estímulo visual, que consistió en la presentación de una flecha con dos orientaciones posibles, derecha o izquierda, en la pantalla del ordenador. Al presentarse el estímulo, los sujetos presionaron la tecla correspondiente a la dirección correcta en el menor tiempo posible. Los datos obtenidos revelaron un menor RT (los sujetos fueron más rápidos) con la mano derecha (ANOVA de dos vías Mano X Tiempo; Mano: $F(1,16)=24.0$, $p=0.0002$). Este resultado probablemente se debió a que todos los sujetos, excepto uno, eran diestros. Por otro lado, no hubo ninguna influencia en los diferentes tiempos de estimulación (Tiempo: $F(2,32)=1.5$, $p=0.24$; Tiempo X Mano: $F(2,32)=1.5$, $p=0.24$). Respecto al número de errores que los sujetos cometieron, se cuantificó un mayor número de fallos al elegir la opción correcta con la mano derecha, posiblemente debido a que la mayoría de los sujetos eran diestros (Mano $F(1,16)=4.8$, $p=0.0440$), cuya causa no guarda relación con estimulación (Tiempo $F(2,32)=1.3$, $p=0.29$; Tiempo X Mano: $F(2,32)=0.9$, $p=0.41$; **Fig. 24**).

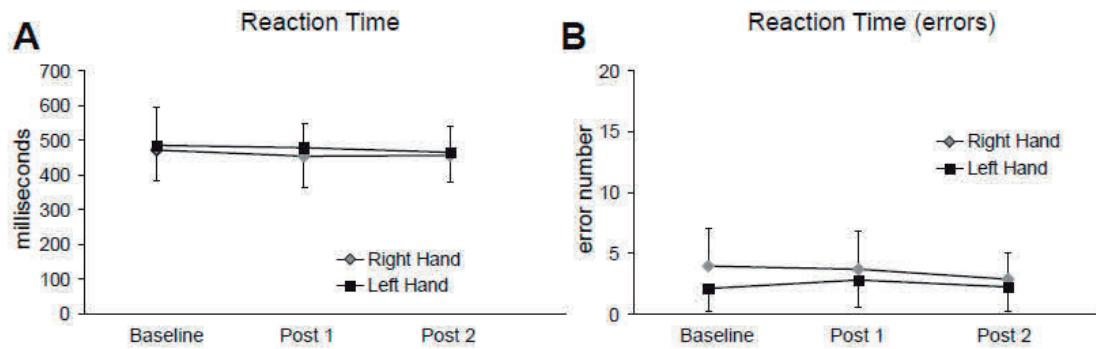


Fig. 24 Curso temporal de la tarea visual-motora de ambas manos.

A) Representación del tiempo invertido en la realización de la tarea (ms) con cada mano. No se encontraron diferencias a lo largo del tiempo teniendo en cuenta cada mano. **B)** Cuantificación del número de errores por cada mano. No hubo cambios significativos a lo largo de las evaluaciones. Las barras de error indican la SD.

La ejecución con la mano que no tenía el catéter del NHPT durante la tSMS fue cronometrada tres veces por cada tiempo. No se observó cambio alguno en el tiempo necesario para la realización de la tarea lo largo de toda la sesión experimental (*t-test* de muestras pareadas: $p=0.22$; **Fig. 25**), con lo que se puede concluir que la aplicación de tSMS no afectó a la realización de la tarea.

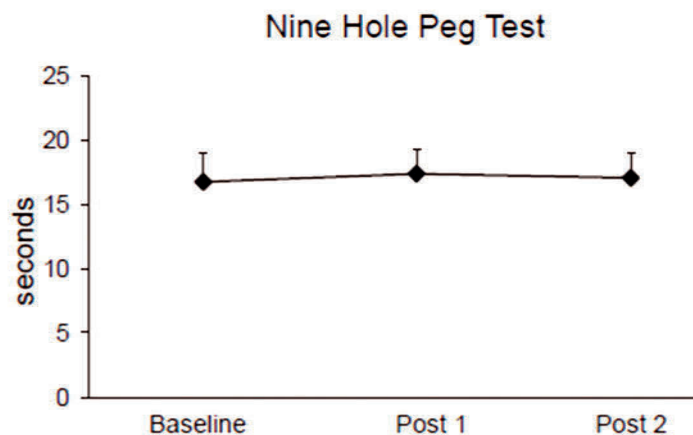


Fig. 25 Curso del tiempo en realizar la tarea NHPT.

La gráfica muestra el promedio de los tres intentos realizados con la mano sin catéter, no observándose cambios en el tiempo empleado para realizar la tarea. Las barras de error representan la SD.

6.2. Experimento 2: Estudio neurofisiológico de la influencia de un campo magnético estático sobre la corteza sensorial primaria izquierda

Se registró la actividad cerebral con EEG durante 46 min, registrando actividad espontánea y evocada antes, durante y después de tSMS.

6.2.1. Frecuencia

El análisis de frecuencia se concentró en el canal C3'C4'. Las bandas de frecuencias objeto del análisis se dividieron en las frecuencias α y β . Los periodos de pausa y los periodos de estimulación eléctrica se analizaron por separado. El análisis estadístico elegido fue ANOVA de dos vías (Intervención X Tiempo) de medidas repetidas.

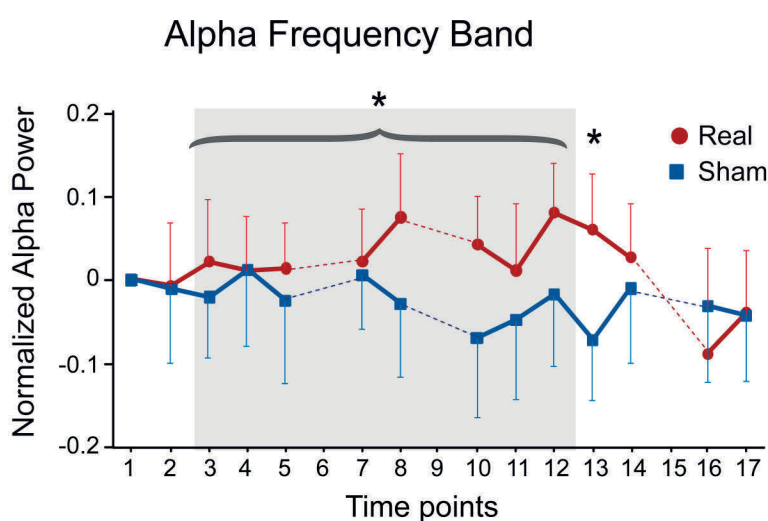


Fig. 26 Curso temporal de la frecuencia α durante los periodos de estimulación eléctrica. Los valores de la banda alfa se normalizaron a los minutos 6-7 de la línea de base y se transformaron en escala logarítmica. La potencia de alfa durante la estimulación real se incrementó durante el periodo de tSMS en el grupo real, continuando hasta 120 s después de la finalización de la estimulación magnética (*time point* 13). Cada *time point* representa 120 s. Las líneas discontinuas representan los periodos de pausa. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza. * $p < 0.05$.

El análisis de frecuencia en el canal C3'C4' se realizó mediante el cálculo de la PSD. Respecto a la frecuencia α (8-12 Hz), los datos revelaron un aumento de PSD a lo largo del tiempo en el grupo real durante los periodos de estimulación. Por el contrario, no se observó efecto alguno en el grupo placebo (**Fig. 26**). Más específicamente, no hubo diferencias en la PSD de frecuencia α durante la línea de base entre los dos grupos (*t-test* de muestras pareadas, $p=0.95$), mientras que sí se observaron durante el periodo de intervención entre grupos (real/placebo) (Intervención: $F(1,12) = 4.8$, $p=0.0487$). Además, el incremento de la potencia de alfa en el grupo real siguió presente en el periodo de post-intervención, pero gradualmente los valores volvieron a aquellos de la línea de base (Tiempo: $F(3,36)=4.4$, $p=0.0096$; Intervención x Tiempo: $F(3,36)=4.2$, $p=0.0125$; Tukey Time_point_13 real VS placebo $p=0.0341$; **Fig. 27**).

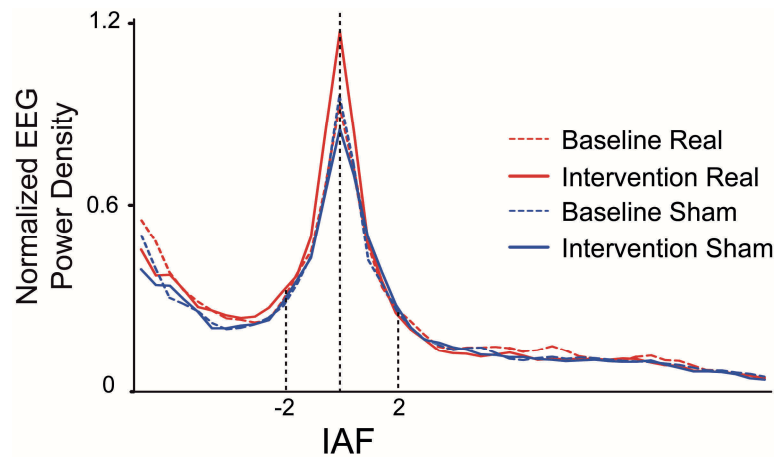


Fig. 27 Densidad espectral de frecuencia α .

El espectro de frecuencia está alineado al pico de alfa individual y normalizado respecto a la línea de base. En el grupo real se incrementó la potencia de alfa (IAF_2 Hz) en el canal C3'C4' en el tiempo 13 de la intervención (línea roja), sin que se observara un aumento en el mismo tiempo en el grupo placebo (línea azul). Las líneas discontinuas (roja y azul) representan la línea de base de ambos grupos con una potencia similar.

Además, los resultados se replicaron durante los periodos de pausas, donde se observó un incremento de la frecuencia de α el grupo real durante los periodo de estimulación (real/placebo) y post-estimulación (Intervención: $F(1,12)=8.6$, $p=0.0124$; **Fig. 28**).

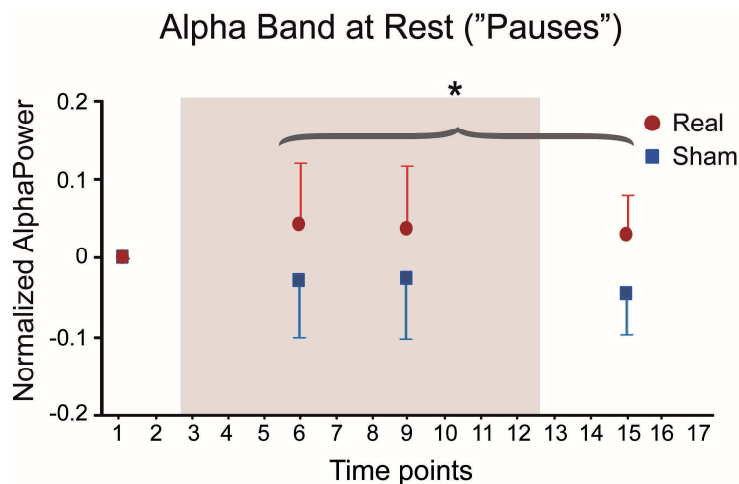


Fig. 28 Representación temporal de la frecuencia α durante los periodos de pausa.

Los valores corresponden al logaritmo transformado de la banda alfa durante los periodos de pausa, normalizados a los minutos 4-5 de la línea de base. El aumento de la banda alfa durante la estimulación real comparado con la placebo se mantuvo hasta el final de la estimulación. Cada *time point* corresponde con 120 s. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza. * $p<0.05$.

El mismo tipo de análisis se repitió centrándose en la banda β (15-29 Hz) para excluir la posibilidad de que el incremento de la banda α fuese debido a un aumento inespecífico de todo el espectro de frecuencia del EEG. El valor del PSD de la frecuencia β del mismo canal (C3'C4') disminuyó a lo largo del tiempo en ambos grupos (Tiempo: $F(12,144)=4.5$, $p<0.0001$), sin diferencias entre el grupo placebo y real (Intervención x Tiempo: $F(12,144)=1.0$, $p=0.46$; **Fig. 29**). Este efecto se puede considerar fisiológico y

creemos que se encontraba relacionado con un aumento en la relajación de los sujetos. Hay que tener en cuenta que los sujetos estuvieron tumbados durante 46 min en una habitación sin ruido y con las luces apagadas.

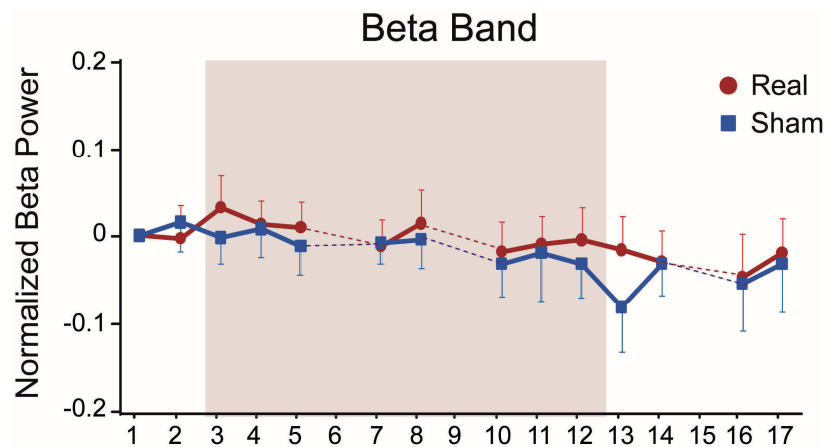


Fig. 29 Representación de la banda β a lo largo del tiempo. Los valores corresponden al logaritmo transformado de la banda β normalizado a los minutos 6-7 de la línea de base. No se presentaron cambios entre la condición real y placebo. Las líneas discontinuas representan los períodos de pausa. Cada *time point* corresponde con 120 s. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza.

6.2.2. Potenciales evocados somatosensoriales (SEPs)

La valoración de los SEPs se realizó para verificar no sólo la afectación de la tSMS sobre las ondas cerebrales, sino además sobre las entradas tálamo-corticales ascendentes. Los SEPs fueron sustraídos del canal C3'C4' y promediados en bloques de 240 s. Los resultados se analizaron con un ANOVA de dos vías (Intervención X Tiempo) de medidas repetidas. Todos los valores fueron normalizados al segundo bloque de la línea de base.

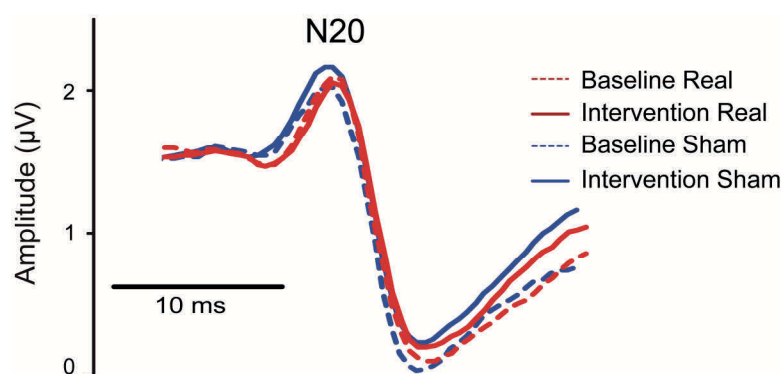


Fig. 30 Promedio general de los SEPs en el canal C3'C4'. Representación del potencial durante la línea de base (líneas discontinuas) y los últimos 5 min de intervención en el grupo real y en el grupo placebo (líneas continuas). No se encontraron diferencias entre la componente N20 entre ambos grupos.

No se observó cambio alguno a lo largo del tiempo en la amplitud de la componente N20 (Tiempo $F(5, 75)=0.4$, $p=0.86$) o entre el tipo de estimulación empleada (Intervención $F(1, 15)=3.4$, $p=0.87$; **Fig.30**).

Se continuó con el análisis de las sucesivas componentes, revelándose que en la componente P25, al igual que en la N20, se habían producido cambios en la amplitud ($p > 0.05$). Sin embargo, sí se observó una disminución de la componente N30 entre el grupo real y el placebo. (Intervención X Tiempo $F(5, 65) = 2.41$, $p=0.04500$).

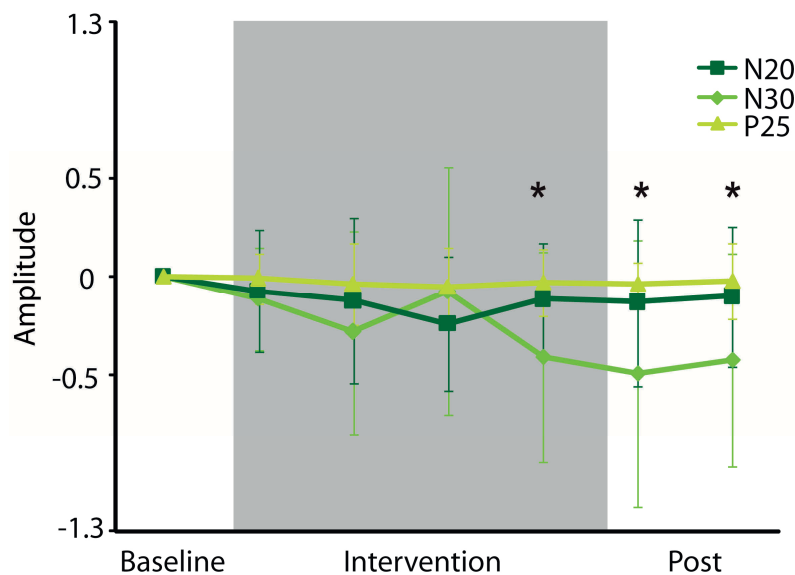


Fig.31 Representación temporal de las componentes N20, P25 y N30.

Los valores corresponden a la amplitud de cada componente del potencial normalizado a los últimos 5 min de la línea de base. La disminución de la componente N30 se produjo a partir de los 15 min de la estimulación. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza. * $p < 0.05$.

Un análisis más detallado mostró que el descenso de la amplitud en este canal se concentró en los últimos 5 min de la intervención y durante todo el periodo post-intervención (Post-hoc Tukey; Intervención4_real VS Intervención4_placebo $p=0.047$; Post1_real VS Post1_placebo $p=0.044$; Post2_real VS Post2_placebo $p=0.030$). Como se representa en la **Fig. 31**, los cambios se concentraron en la componente tardía N30 excluyendo la posibilidad de una influencia de los SMS en la llegada de la información sensorial.

6.2.3. Oscilaciones de alta frecuencia (HFO)

A continuación procedimos al análisis de las HFO asociadas a un estímulo eléctrico. Estas oscilaciones constan de dos componentes, una temprana y otra tardía. Cabe recordar que se registra su actividad de un modo óptimo con el dipolo C3'F3 (Curio et al, 1997). El análisis se realizó calculando la amplitud de cada subcomponente en bloques de 10 min. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de medidas

repetidas de dos vías (Intervención X Tiempo). Todos los valores fueron normalizados a partir del minuto 5 de la línea de base.

La amplitud de la componente temprana del grupo real aumentó relativamente respecto al grupo placebo durante la intervención y la post-intervención (Intervención $F(1,14)=5.6314$, $p=0.0325$). Este aumento en el grupo real refleja una mayor actividad de las neuronas piramidales y de la conexión tálamo-cortical. Sorprendentemente, no se observó cambio alguno en la componente tardía (Intervención $F(1,14)=0.0116$, $p=0.9156$; **Fig. 32**).

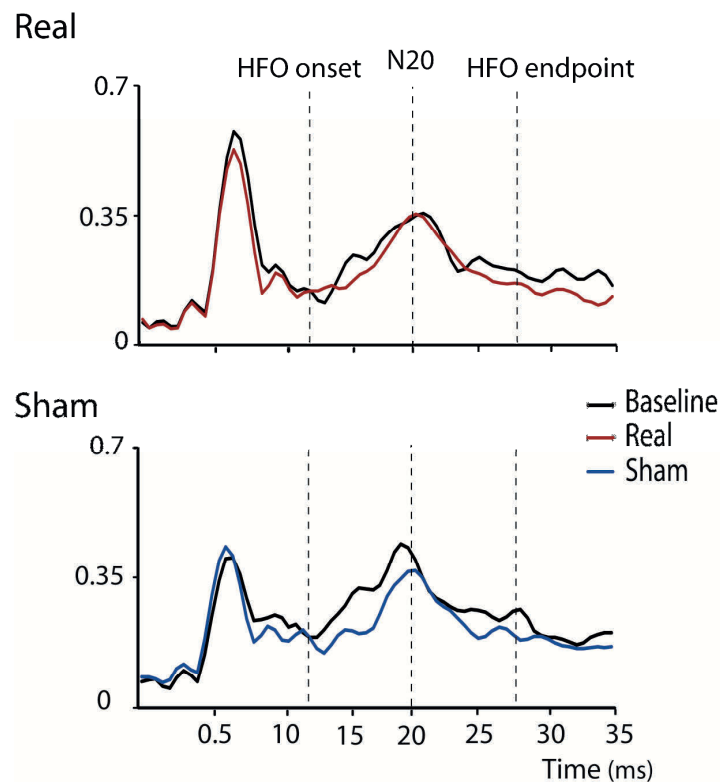


Fig. 32 Promedio general de HFO grupo real/placebo respecto a su correspondiente línea de base. Representación de la amplitud de la envolvente de las HFO entre la línea de base (línea negra) y los últimos 10 min de estimulación en el grupo real (línea roja) y el grupo placebo (línea azul). Las líneas discontinuas marcan el pico de la componente N20 y delimitan el comienzo y el final de las HFO (*onset point* y *end point*). La componente temprana del grupo real fue mayor durante la intervención que en el grupo placebo.

6.2.4. ERB y MEP

A nivel periférico se registró un potencial en el músculo adductor del pulgar, el cual se encuentra inervado por el nervio mediano. El análisis de la amplitud del MEP se realizó en bloques de 600 s y no mostró cambios entre el grupo real y placebo a lo largo del tiempo (t -test de muestras no pareadas $p>0.05$) como se muestra en la **Fig. 33**. Asimismo, en el potencial ERB registrado a nivel cervical tampoco se encontraron diferencias (t -test de muestras no pareadas $p>0.05$), lo que evidencia que la tSMS tiene un efecto focal.

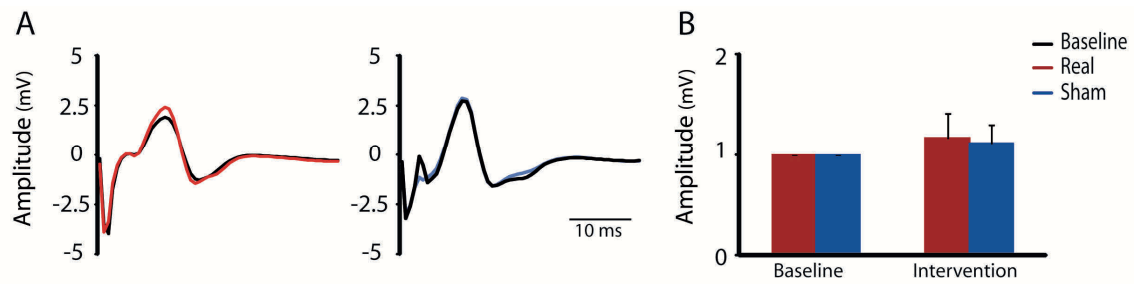


Fig. 33 Potencial MEP.

A) Representación del promedio general del potencial MEP en el grupo real y placebo durante los últimos 10 min de la intervención (línea roja: real, línea azul: placebo) VS la línea de base (línea negra). **B)** Gráfica normalizada respecto a la línea de base que indica el porcentaje de cambio en el potencial MEP. No se encontraron cambios en la magnitud del potencial MEP.

6.3. Experimento 3: Estudio de la influencia de un campo magnético estático sobre la corteza sensorial primaria izquierda ante un estímulo eléctrico en el dedo índice derecho.

Los sujetos realizaron la tarea de comportamiento cerca del umbral de detección de sensibilidad, la cual tuvo una duración de 30 min y fue dividida en tres bloques de 10 min cada uno (línea de base, intervención y post-intervención). En el segundo bloque los sujetos se encontraron bajo la influencia de un tSMS o una estimulación placebo.

6.3.1. Probabilidad de Respuesta (PR)

En primer lugar, se valoró la capacidad global de detección de un estímulo eléctrico por parte de los sujetos. Las respuestas positivas fueron promediadas en un sólo tiempo para cada bloque (línea de base, intervención y post-intervención). Como se observa en la **Fig. 34**, se encontraron diferencias en la PR entre el grupo real y placebo (Intervención X Tiempo; $F(2,80)=4.89$; $p=0.0098$). Más específicamente, en el grupo placebo la PR disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo (Línea de base VS Intervención, Tukey $p=0.058$, y Línea de base VS Post-intervención, $p=0.0001$), mientras que no se observaron cambios en el grupo real ($p=0.73$).

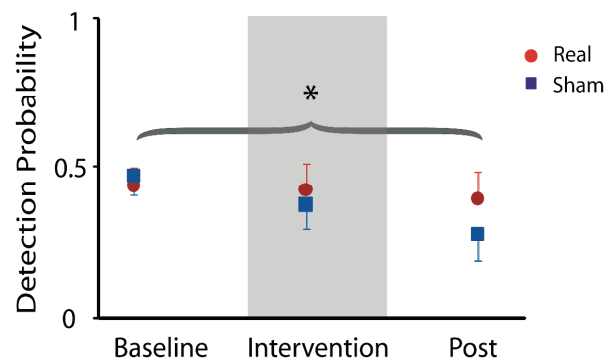


Fig. 34 Representación de la probabilidad de respuesta (un punto por bloque; 10 min por bloque) del Exp. 3. La PR disminuye a lo largo del tiempo en el grupo placebo y no en el real. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza. * $p<0.05$.

Con el objetivo de comprender la habituación, se cuantificó la PR en sub-bloques de 5 min (dos valores por los bloques analizados previamente). En la línea de base, se observó un efecto de habituación en ambos grupos (Tiempo: $F(1,40)=22.0$, $p<0.0001$). Sin embargo, durante la intervención sólo el grupo placebo tuvo una clara habituación (Intervención x Tiempo: $F(1,40)=5.7$, $p=0.0213$; Tukey, Intervención1_Shám VS Intervención2_Shám $p=0.0002$; Intervención1_Real VS Intervención2_Real $p=0.074$; **Fig. 35**). Por tanto, se confirmó que la tSMS mejora la percepción somatosensorial y así la habituación fisiológica fue reducida durante la estimulación. Durante la intervención se encontró una mayor PR en el grupo placebo comparado con el grupo real (t -test de muestras no pareadas, $p=0.021$). En la post-intervención, un cambio a lo largo del

tiempo estuvo de nuevo presente en ambos grupos (Tiempo: $F(1,40)=26.3$, $p<0.0001$; **Fig. 35**).

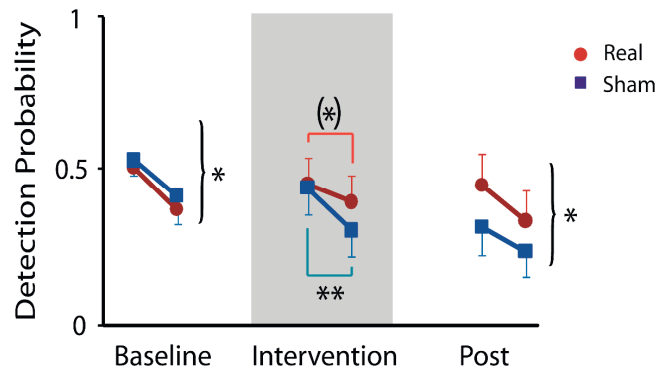


Fig. 35 Curso temporal de la PR cada 5 min.

En la línea de base la PR en ambos grupos muestra una habituación significativa (* $p<0.05$), mientras que durante la intervención, se observó un efecto fuerte de habituación en el grupo placebo (** $p<0.01$) y una cierta tendencia, no significativa estadísticamente, en el grupo real (* $p<0.1$). Al igual que en la línea de base, se apreció un efecto en la post-intervención en ambos grupos (* $p<0.05$). Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza.

6.3.2. Tiempo de reacción (RT)

El análisis del RT se realizó promediando todos los tiempos de respuesta en un sólo tiempo para cada bloque (**Fig. 36**). Las diferencias en la PR fueron paralelas a las diferencias en el RT (Intervención x Tiempo $F(2,80)=4.69$; $p=0.0118$). Un análisis más detallado mostró que el RT aumentó progresivamente en el grupo placebo (*follow-up* ANOVA, Tiempo: $F(2,38)=3.6$, $p=0.0363$; Tukey: línea_de_base_placebo VS post_placebo $p=0.0279$) pero no en el grupo real (Tiempo: $F(2,42)=1.32$, $p=0.28$).

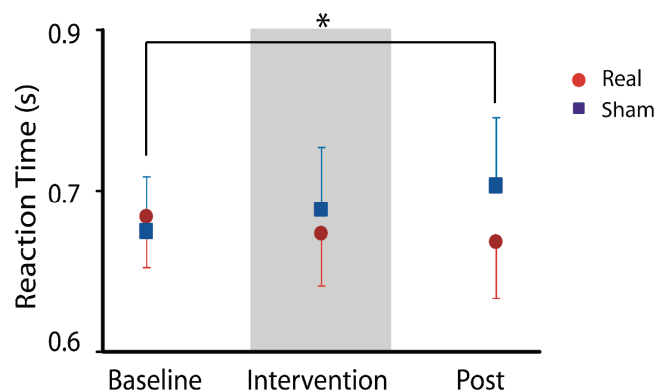


Fig. 36 Curso temporal del tiempo de reacción ante la detección del estímulo.

El RT aumentó progresivamente a lo largo de los tres tiempos experimentales en el grupo placebo pero no en el real. La respuesta tras la presentación del estímulo fue mayor en la comparación entre la línea de base y el post en el grupo placebo. Las barras de error indican el 95% de intervalo de confianza. * $p<0.05$.

Discusión

Los datos presentados en esta tesis confirman que los campos magnéticos estáticos influyen en los sistemas biológicos en general y en los seres humanos en particular. En esta tesis se ha visto que este efecto tiene lugar no sólo a nivel electrofisiológico, sino también a nivel comportamental, afectando a la percepción sensorial. Además, se demuestra que la tSMS es una técnica de NIBS segura al igual que la tDCS (Nitsche et al, 2003b) o la rTMS (Ullrich et al, 2013).

Cuando pensamos en los campos magnéticos y sus efectos sobre los seres vivos, uno de los primeros ejemplos que se nos ocurren son los animales que utilizan líneas de fuerzas magnéticas terrestres para orientarse, como por ejemplo las aves migradoras que se sirven del campo magnético terrestre como una “brújula magnética” (*magnetic compass* en inglés) (Hiscock et al, 2016). Sin embargo, existen numerosos ejemplos en la literatura que muestran que no son los únicos seres vivos capaces de percibir el campo magnético (“*magnetoreception*” en inglés). En bacterias (Madigan et al, 2004), cilioforos (Roberts, 1970), nematodos (Vidal-Gadea et al, 2015), artrópodos (Schiff, 1991), algunas aves (Ritz et al, 2004) y algunos mamíferos (Begall et al, 2008) su influencia también ha sido demostrada a lo largo de varias décadas. Además de estos campos de origen natural, existe un número creciente de trabajos que describen cómo los diferentes SMS artificiales pueden influir en los sistemas biológicos (Aguila et al, 2014; Cavopoli et al, 1995; Coots et al, 2004; Gonzalez-Rosa et al, 2015; Kirimoto et al, 2014; Nojima et al, 2015; Oliviero et al, 2011; Roberts et al, 2011; Rosen, 2003a; b; Rosen & Lubowsky, 1987). Más concretamente, se ha descrito que los humanos inmersos en SMS de alta intensidad (desde 1,5 T hasta 10 T) refieren una serie de efectos tales como mareos, vértigos, fosfenos, etc., y se cree que el origen de estos efectos se encuentra relacionado de un modo general con los sistemas vestibular y visual. Más específicamente, este movimiento de tejidos conductores eléctricos dentro de un SMS genera un campo eléctrico (basado en la Ley de Faraday).

En la primera fase de la presente tesis hemos demostrado que la exposición durante 2 h a una **tSMS es segura al no producir daño alguno a nivel celular**. Para ello se utilizaron dos marcadores proteicos: 1) NSE, cuyo aumento en experimentos de este tipo indica muerte neuronal (Kaiser et al, 1989); y 2) S100 β , que al igual que en el caso del otro marcador, un aumento de su concentración se correlaciona con muerte o activación glial (Rothermundt et al, 2003). Estos marcadores se han empleado previamente en otros estudios de seguridad de técnicas de NIBS, así como de nuevas técnicas de neuromodulación (Chaieb et al, 2014; Nitsche et al, 2003b). En nuestro estudio, la concentración del biomarcador NSE no se modificó durante y después de la aplicación de tSMS, demostrando así que no hubo muerte neuronal causada por la aplicación de tSMS. Sorprendentemente, los niveles de S100 β no sólo no aumentaron sino que disminuyeron, lo cual fue suficiente para demostrar que la tSMS no causó

muerte o reactividad glial. Sin embargo, la disminución de los niveles de S100 β sugiere una posible reducción de la reactividad glial, la cual ha sido relacionada con protección tisular (Donato et al, 2013). No obstante, una limitación de nuestro protocolo experimental se encuentra relacionada con su propio diseño, cuyo único objetivo era demostrar la seguridad de la técnica. Por tanto, para probar que la disminución de la S100 β (y teóricamente el aumento de protección tisular) fuese causada por la tSMS, hubiese sido necesario un diseño de doble ciego y controlado con un placebo. Por otro lado, respecto a las pruebas de comportamiento (los tests cognitivos y motores) tampoco se observó empeoramiento alguno durante su realización. Este hecho contrasta con otros estudios realizados previamente tanto en humanos (Gonzalez-Rosa et al, 2015), como en animales (Aguila et al, 2014), además de los resultados expuestos en el presente trabajo (Exp. 3), donde se ha observado una clara interacción entre la ejecución de la tarea y la estimulación con tSMS. Esta diferencia en el comportamiento depende de la sensibilidad de la prueba para cada diana estimulada ya que en un experimento de seguridad se realizan pruebas “groseras” a la hora de valorar su efecto sobre el comportamiento global a nivel motor y cognitivo. Sin embargo, las pruebas elegidas en el Exp. 1 son poco sensibles para evaluar si la tSMS produce efectos específicos sobre el comportamiento. Por el contrario, en el Exp. 3 se diseñó una tarea específica (ej. una tarea sensitiva para corteza S1) con suficiente sensibilidad (ej. mayor grado de dificultad) para la corteza donde se colocó la tSMS con el fin de detectar diferencias más sutiles. Por tanto, podemos concluir que **durante la aplicación de tSMS, así como en las 2 h siguientes no se observaron alteraciones cognitivas o motoras relevantes para la seguridad del sujeto.**

Normalmente, las técnicas de NIBS incluyen en su protocolo de valoración de seguridad un estudio de EEG con la finalidad de descubrir si hay un aumento del riesgo de crisis epilépticas durante o después de la estimulación. Puesto que la tSMS es una técnica que reduce la excitabilidad cortical, no debería de existir riesgo alguno de inducción de crisis epilépticas. Es más, se ha demostrado que la tSMS reduce la actividad epiléptica en modelos animales (McLean et al, 2003; McLean et al, 2008). Por todo ello, en nuestro estudio no fue incluido el EEG.

Hay que destacar que los resultados negativos de nuestro estudio de seguridad están de acuerdo con los informes emitidos por la Organización Mundial de la Salud, en los que se describe que es seguro trabajar en campo magnéticos estáticos de intensidad de hasta 200 mT. Además, en dichos informes se establece que sigue siendo seguro estar expuesto ocasionalmente a campos mucho más intensos, con picos de hasta 10 Tesla, como por ejemplo en plantas de producción de electricidad o en resonancias magnéticas (<http://www.who.int/peh-emf/publications/facts/fs299/es/>).

Además, cabe subrayar que, aunque un resultado negativo fuera esperado, nos pareció correcto valorar la seguridad de los imanes de neodimio porque existen diferencias físicas entre el campo creado por un imán de neodimio y el campo generado por una resonancia magnética o en una planta de producción eléctrica. Así, la diferencia reside en que el primero es un campo focal mientras que el segundo y el tercero crean un campo homogéneo donde el sujeto se introduce (en el caso de la planta eléctrica el campo puede cambiar en el espacio y los sujetos se encuentran en movimiento).

Una vez demostrada formalmente la seguridad de la tSMS, empezamos una segunda fase de realización de la tesis, en la que hemos descrito los efectos de la tSMS sobre la corteza parietal. Las principales conclusiones de este apartado son:

- 1) **la tSMS parietal aumenta las oscilaciones del EEG en la banda alfa** en la corteza parietal;
- 2) la tSMS no altera las componentes precoces de los SEPs;
- 3) **la tSMS parietal aumenta las componentes tempranas de HFOs;**
- 4) **la tSMS parietal aumenta la componente N30 de los SEPs;**
- 5) la tSMS del lóbulo parietal **mejora la detección de estímulos somatosensoriales** a intensidades próximas al umbral.

El diseño doble ciego controlado por placebo descarta la posibilidad de que los resultados se deban a un sesgo del experimentador o del voluntario, a fatiga, aburrimiento o aparición de sueño a lo largo de los experimentos.

Efectos neurofisiológicos de la tSMS sobre corteza parietal

En la corteza visual está establecido que a una mayor potencia oscilatoria alfa se asocia una reducción de la excitabilidad cortical, y que esto produce un deterioro en la ejecución de una tarea visual (Hanslmayr et al, 2007; Thut et al, 2006). En un estudio anterior, hemos demostrado que la tSMS en la corteza visual aumenta específicamente las oscilaciones alfa occipitales, empeorando la ejecución de una tarea de búsqueda visual (Gonzalez-Rosa et al, 2015), replicando así los datos descritos anteriormente en la literatura en corteza visual. En el presente trabajo hemos visto que la misma técnica (tSMS) induce un aumento similar de oscilaciones alfa cuando se aplica sobre la corteza parietal. Sin embargo, este aumento de las oscilaciones alfa se encuentra asociado a una mejora, en lugar de un deterioro, de la percepción somatosensorial. De igual modo que en el trabajo precedente (Gonzalez-Rosa et al, 2015), sólo se ha observado un cambio de frecuencia en la banda alfa y no en todo el espectro de frecuencia, resaltando la influencia "selectiva" de la estimulación por la frecuencia alfa. Esta frecuencia se

relaciona con una gran variedad de actividades como, por ejemplo, el cálculo mental (Palva et al, 2005) o la memoria a corto plazo (Jensen et al, 2002). No obstante, la función exacta de la frecuencia alfa no está definida todavía. Así, algunos autores relacionan las oscilaciones alfa con el nivel de inhibición en la corteza, estructura en la que se propone que las amplitudes pequeñas de alfa están relacionadas con aquellas regiones que reflejan actividad neuronal de procesamiento, mientras que las amplitudes mayores de alfa reflejan la inhibición de la corteza para tareas menos relevantes (Klimesch, 1996; Klimesch et al, 2007; Pfurtscheller, 2001; 2003; Ray & Cole, 1985). Por el contrario, otros autores que analizaron la actividad alfa en ensayos únicos (*single trial*) en tareas sensoriales, observaron que la frecuencia alfa no tiene una correlación lineal con la inhibición cortical (Linkenkaer-Hansen et al, 2004). Nuestros datos revelan una mejora de la percepción somatosensorial durante el Exp. 3 que asociamos al aumento de la frecuencia alfa observado en el Exp. 2. No obstante, en nuestro estudio no fue posible llevar a cabo la tarea de comportamiento al mismo tiempo que el EEG debido a una limitación logística. Por último, cabe destacar que nuestro experimento control (ver Anexo 1) demostró que dicho aumento de la frecuencia alfa no es consecuencia de ningún tipo de artefacto sobre los aparatos del registro del EEG (Gonzalez-Rosa et al, 2015), sino que es inducido por la propia tSMS.

Respecto al análisis de los potenciales evocados, no se apreció variación alguna en la amplitud de la componente N20, cuya respuesta es generada por los potenciales excitatorios post-sinápticos de las células piramidales de capa IV en corteza S1, la entrada principal desde tálamo (Allison et al, 1989), durante y/o después de la estimulación en el Exp. 2. Esta falta de cambio indicaría que el efecto de la tSMS tiene lugar a nivel cortical y que su alcance no penetra hasta estructuras subcorticales más profundas, ya que la intensidad del campo se reduce con el aumento de la distancia (Rivadulla et al, 2014). Por tanto, podemos concluir que es poco probable que esta mejora de la percepción somatosensorial observada en el Exp. 3 sea debida a un aumento de las entradas tálamo-corticales por la acción de la tSMS. La ausencia de modulación de la N20 también está presente en otros protocolos de estimulación cerebral inhibitoria, como por ejemplo la cTBS, donde no se encontró alteración alguna en la amplitud de los SEPs (Katayama et al, 2010). En cambio, un análisis más detallado de las componentes de alta frecuencia de la N20 (HFOs) reveló cambios en las amplitudes de estas ondas (las HFOs tempranas aumentaron mientras que las tardías disminuyeron) (Katayama et al, 2010). Estos datos coinciden con otros publicados anteriormente, donde a pesar de la falta de modulación de la N20 tras una intervención de rTMS a 1Hz en S1 (una frecuencia de TMS clásicamente inhibitoria), los autores encontraron que la componente temprana de las HFOs aumentó mientras que la tardía

disminuyó (Restuccia et al, 2007). A diferencia de nuestro trabajo, esos estudios carecieron de grupo placebo.

En nuestro caso, el estudio de las HFOs demostró cómo la amplitud de sus componentes tempranas aumentó en el grupo real respecto al grupo placebo, concordando con los estudios de estimulaciones inhibitorias citados anteriormente. El efecto observado en el grupo placebo no está relacionado con un cambio de la estimulación periférica puesto que las componentes ERB (Exp. 2) y el registro del SAP (Anexo 1) no cambian a lo largo del experimento, siendo medidas de control ante un posible error en el protocolo experimental. No obstante, este dato se podría interpretar como un posible efecto de la propia estimulación periférica (3 Hz) o un efecto de habituación, sin embargo hay que destacar la poca literatura existente acerca de protocolos de habituación y HFOs tiende a sugerir que no es fácil valorar la habituación de estas componentes (Restuccia et al, 2011; Restuccia et al, 2014).

Asimismo, el análisis de la componente tardía N30 de los SEPs reveló una disminución de la amplitud, cuya actividad se encuentra relacionada con los generadores superficiales de las áreas 1 y 2 (Allison et al, 1989; Allison et al, 1991). Al igual que en las HFOs, esta disminución no está relacionada con algún tipo de alteración en la estimulación periférica, puesto que las componentes ERB (Exp 2.) y el registro del CMAP (Anexo1) no cambiaron, ni tampoco con la entrada de la señal en S1, ya que la componente N20 mantuvo la misma amplitud durante el experimento para ambos grupos.

La variación de la amplitud tanto de las HFOs tempranas como en la componente N30 sugeriría una facilitación, es decir, un aumento de la actividad cortico-cortical de neuronas piramidales, produciendo así un aumento de la actividad alfa. La aparición reciente de un estudio realizado en resonancia magnética (campo magnético homogéneo, no focal) confirma que dicho campo puede alterar la excitabilidad en cortical en M1 (Nojima et al, 2015). Utilizando protocolos de valoración de la excitabilidad con TMS, SICI y periodo de silencio, sus datos revelan un incremento de la actividad de los circuitos inhibitorios corticales, los cuales podrían estar relacionados parcialmente con la interacción del sistema GABAérgico (Nojima et al, 2015). Los datos de Nojima han sido replicados en nuestro laboratorio, pero a diferencia de éste hemos observado que con una duración de tSMS más larga, la actividad de los circuitos inhibitorios de la M1 también se inhibe (*datos no publicados*). Por ello, podríamos interpretar que en la corteza parietal la tSMS produce una facilitación relativa debido a una disminución local de los circuitos GABAérgicos.

Contrariamente a nuestros datos, esta facilitación no se produjo en el grupo real, lo cual puede ser interpretado como una inhibición del efecto facilitatorio, dato que concuerda

con el descrito previamente por el grupo de Onishi, el que describió una disminución de la componente N20 tras una estimulación de 15 min en corteza M1 (Kirimoto et al, 2014). Probablemente, la diferencia de comportamiento de la componente N20 en ambos experimentos (Exp. 2 y Kirimoto *et al.*,) se encuentre relacionada con las diferentes redes activadas por la localización de la estimulación. En nuestro caso, la estimulación se colocó en S1, mientras que el grupo de Onishi fue en M1, región que se encuentra anatómicamente muy conectada con S1 (Buonomano & Merzenich, 1998; Feldman, 2009), y que puede activar proyecciones desde M1 hasta S1, afectando el procesamiento sensitivo (Enomoto et al, 2001).

Efectos de la tSMS en corteza parietal sobre la percepción somatosensorial

La tSMS en el lóbulo parietal mejora la detección de estímulos somatosensoriales a intensidades próximas al umbral respecto al grupo que recibe la tSMS placebo. Observamos que el grupo placebo desarrolla una habituación a lo largo de los 30 min de experimento, la cual no fue detectada en el grupo real. La habituación se define como la disminución de la capacidad de detección de un estímulo como resultado de una estimulación repetida no relacionada con la fatiga sensorial o motora (Rankin et al, 2009). Para estudiar este fenómeno con más precisión, realizamos un análisis más detallado de los datos en periodos de 5 min, obteniendo en consecuencia 2 puntos para cada uno de los 3 bloques (línea de base, intervención y post). Este análisis en profundidad nos permitió determinar que el segundo punto de cada bloque presentaba un porcentaje de acierto menor que el primero, confirmando que el principal efecto producido por la tSMS (la falta de habituación) era robusto y reproducible. La valoración de los tiempos de reacción confirmó que cuanto menor es la probabilidad de detectar un estímulo debido a la habituación, mayor es el tiempo de respuesta. Así, obtuvimos en el grupo real unos tiempos de reacción significativamente menores. En conjunto, estos datos muestran que la tSMS del lóbulo parietal **mejora la detección de estímulos somatosensoriales** a intensidad próxima al umbral, posiblemente porque interfiere y reduce los mecanismos fisiológicos de la habituación.

La falta de entrenamiento antes de realizar la prueba se presenta como una limitación de este estudio. Mientras que los datos obtenidos a umbral son contundentes/fiables como muestran otros estudios de sensibilidad (Linkenkaer-Hansen et al, 2004; Monto et al, 2008), el entrenamiento en pruebas de comportamiento evitaría el "efecto suelo" en tareas de sensibilidad (Feurra et al, 2011; Rogalewski et al, 2004), tal y como se observa en el tiempo post del Exp. 3 en el grupo placebo. El entrenamiento previene este efecto suelo ya que permite que la prueba pueda desarrollarse a un ~75% de sensibilidad, mientras que en nuestro caso nos ajustamos al umbral de sensibilidad (~50%) sólo antes

de comenzar la tarea. Hay que destacar que los efectos observados no se limitan sólo al periodo de la estimulación, sino que permanecen después de su finalización. No obstante, el post-efecto, tal y como se describió recientemente, es proporcional al tiempo de exposición, es decir, cuanto más tiempo de exposición, más tiempo tarda en extinguirse el efecto producido (Aguila et al, 2014). Evidentemente, sería óptimo comprender si este efecto es local (S1) o si, por el contrario, estimulando la corteza motora también se produce alguna interferencia en el procesamiento de la información sensorial, ya que la activación de M1 influye en la modulación somestésica a tres niveles diferentes vía cortico-cortical, tálamo y los núcleos de la columna posterior (Chapman et al, 1988). Esta influencia en S1 ya fue observada en experimentos con técnicas de neuromodulación inhibitorias sobre M1 por ejemplo como la tDCS catódica (Rogalewski et al, 2004) o por el contrario técnicas de neuromodulación excitatorias como la rTMS a 10Hz (Lefaucheur et al, 2001).

Por otro lado, la falta de habituación se puede relacionar también con un posible aumento de la frecuencia alfa ya que se ha descrito la correlación con una función parabólica entre la frecuencia alfa y la percepción sensorial (Jones et al, 2007; Linkenkaer-Hansen et al, 2004). Esta relación indica que una mayor cantidad de frecuencia alfa previa a un estímulo sensorial de tipo eléctrico aumenta la probabilidad de detección de dicho estímulo en corteza parietal. Así se establece una relación entre el aumento de la frecuencia alfa y los resultados observados en el experimento de comportamiento. Cabe subrayar que la actividad alfa que se representa en la corteza parietal no es la frecuencia dominante de dicha corteza, por lo que, probablemente, la modulación de estas ondas en S1 necesiten de más tiempo que en corteza visual, cuya modulación se presenta durante los primeros minutos tras la exposición a tSMS (Gonzalez-Rosa et al, 2015). Por tanto, es razonable especular que una sincronización transitoria de generadores neuronales corticales de actividad alfa podría ser el mecanismo responsable de la mejora de la percepción somatosensorial inducida por la tSMS. No obstante, otros mecanismos adicionales no pueden, obviamente, ser excluidos. Por lo tanto, la mejora del comportamiento inducido por la tSMS puede ser debido a un cambio del estado cortical, reflejado al menos en parte por el aumento de las oscilaciones alfa obtenidas en el EEG y no a las entradas de las señales de corteza.

Una posible limitación de este estudio es que no se midieron simultáneamente las oscilaciones de la frecuencia alfa y las pruebas de comportamiento en los mismos sujetos, lo que podría ayudar a aclarar si hay una correlación entre el aumento de la frecuencia alfa y la mejora de la tarea en la prueba de comportamiento. Sin embargo, tal experimento sería muy exigente debido al elevado número de estímulos necesarios, y no necesariamente concluyente a causa de la habituación observada. En cualquier caso,

nuestros datos permiten afirmar que un aumento focal inducido de las oscilaciones alfa mejora la percepción somatosensorial.

Como una estrategia de estimulación cerebral no invasiva alternativa, podríamos haber utilizado otra técnica que “inyecta” directamente oscilaciones alfa en la corteza estimulada, tales como la tACS (Vossen et al, 2015; Zaehle et al, 2010) o la rTMS a 10 Hz (Klimesch et al, 2003; Romei et al, 2010). Estas técnicas son capaces de interferir en los ritmos de la actividad neuronal aumentando la potencia de las oscilaciones alfa además de ser capaces de bloquear su fase. En nuestro caso, la tSMS también aumenta la potencia de las oscilaciones alfa, pero deja la fase libre de cambiar con su variabilidad fisiológica. El papel de la fase de las oscilaciones alfa en la detección de estímulos somatosensoriales requiere más investigación.

Nuestros datos sugieren que el efecto sensorial producido por la tSMS es una interferencia con un proceso de habituación. Hasta la fecha, poquísimos estudios han utilizado las técnicas de NIBS para estudiar o manipular la habituación sensorial. Nuestros resultados apuntan hacia una conexión entre la habituación sensorial y la actividad alfa. Esta conexión podría ayudar a explicar la relación no lineal entre las oscilaciones alfa y el comportamiento somatosensorial descrito en la literatura.

Consideraciones sobre los mecanismos de la tSMS sobre corteza parital

El SN es un sistema cuya funciones fisiológicas están basadas en el flujo de corrientes iónicas a través de las membranas celulares, flujos selectivos de iones, compartición de cargas, etc., es decir, principios "eléctrico-químicos". En modelos teóricos se ha demostrado que la conducción nerviosa se puede modificar en presencia de un SMS suficientemente intenso (24 T) (Wikswow & Barach, 1980), aunque existe en la literatura un número creciente de referencias que describen cómo los SMF pueden influir en los sistemas biológicos a intensidades relativamente bajas, con algunos cientos de miliTeslas se consigue obtener efectos sobre determinadas estructuras del SNC (Coots et al, 2004; Rosen, 2003a; b; Rosen & Lubowsky, 1987).

El mecanismo de acción preciso de la estimulación con campos magnéticos a nivel celular todavía no está claro. La teoría más aceptada es la posible influencia en los canales de sodio y potasio debido a su cambio de conformación y, por tanto, su eficacia dentro de la célula (Rosen, 2003a). No hay que olvidar, que estos canales se encuentran dentro de una membrana lipídica con propiedades diarmagnéticas donde es muy importante la geometría para lograr una funcionalidad óptima. Por último, hay que destacar que si sólo tenemos en cuenta la influencia de los SMS sobre las moléculas,

nos encontraremos una limitación mecánica en el cambio de geometría de las moléculas (Rosen, 2003b), por lo que, para poder hablar de procesos de potenciación a largo plazo, en este caso asociado a la inhibición (LTD), hay que tener en cuenta otros posibles factores tal como la expresión génica a corto plazo presentes tanto en la TMS como en la tDCS mostraron una expresión diferencial de *zif268* y *cFos* asociado a la estimulación (Aydin-Abidin et al, 2008; Ranieri et al, 2012). Por razones obvias de viabilidad, este tipo de estudios en humanos es muy limitado y complicado de realizar. Hasta la fecha, todos los estudios realizados en humanos duran menos de diez minutos tras la finalización de la estimulación, mientras que los procesos de LTD se relacionan con efectos más a largo plazo (~30 min). Sin embargo, un estudio en mono y gato ha demostrado que el efecto producido está directamente relacionado con el tiempo de exposición a los SMS (Aguila et al, 2014). Por tanto, para poder inducir procesos de LTD, en primer lugar se ha de aumentar el tiempo de exposición, con la necesidad de desarrollar un sistema cómodo para los sujetos. En segundo lugar, es conveniente desarrollar otros tipos de estrategias de estimulación para potenciar el efecto como, por ejemplo, estimular 5 días seguidos con para la reducción del dolor (Fregni et al, 2006).

Nuestros datos muestran que la tSMS en la corteza parietal afecta tanto a la actividad EEG de la frecuencia alfa y a la capacidad de percepción somatosensorial en pruebas de comportamiento. En comparación con otras técnicas de neuromodulación no invasiva, tales como la tDCS, tACS o rTMS, la tSMS induce los efectos electrofisiológicos ya mencionados en el comportamiento sin emplear pulsos magnéticos variables en el tiempo y que son capaces de inducir campos eléctricos en el tejido estimulado. Por lo tanto, tras los datos presentados en el presente trabajo, llegamos a la conclusión de que los campos magnéticos estáticos focales pueden interferir con la función normal del cerebro incluso a una intensidad de 120 a 200 mT (en 2 a 3 cm de la superficie de imán). En conjunto, todos estos datos ponen en relieve que la tSMS es una técnica, a la vez portátil y de bajo coste, ideal para modular la actividad cerebral en humanos y, en consecuencia, su comportamiento. Esta nueva técnica de estimulación se está incluyendo poco a poco como una herramienta más dentro de la familia de técnicas de estimulación cerebral no invasiva. Otros miembros de este grupo, como la TMS y la tDCS, a pesar de haber sido ampliamente utilizadas, a día de hoy todavía igualmente se desconocen los mecanismos de acción. Por todo ello, creemos necesario profundizar en su estudio y uso en investigación básica y clínica con el fin de conocer mejor su mecanismo de acción preciso, así como nuevos efectos fisiológicos y sus potenciales aplicaciones. En su conjunto, estas técnicas de estimulación, seguras, no invasivas y no dolorosas, se presentan como prometedoras candidatas para desarrollar óptimos tratamientos de fácil aplicación a pacientes con determinadas patologías neurológicas.

Conclusiones

1. Los SMS son una técnica segura que no producen ningún daño tanto a nivel celular (muerte celular o reactividad glial) como a nivel cognitivo.
2. La aplicación de tSMS en corteza parietal produce un aumento de la frecuencia alfa en dicha corteza. Este cambio no se encuentra asociado a un aumento en las entradas en corteza desde el tálamo puesto que la componente N20 no modifica su amplitud.
3. La tSMS produce cambios en la componente tardía N30 de los potenciales evocados, la cual está relacionada con el procesamiento de las señales somatosensoriales.
4. La estimulación magnética genera una disminución de la capacidad de habituación ante un estímulo somatosensorial repetido durante y después de una exposición a la tSMS, sin que produzca un aumento en el tiempo de reacción de la detección del estímulo.

Bibliografía

- Aftanas, L. I. & Golocheikine, S. A. (2001) Human anterior and frontal midline theta and lower alpha reflect emotionally positive state and internalized attention: high-resolution EEG investigation of meditation. *Neurosci Lett*, 310(1), 57-60.
- Aguila, J., Cudeiro, J. & Rivadulla, C. (2014) Effects of Static Magnetic Fields on the Visual Cortex: reversible Visual Deficits and Reduction of Neuronal Activity. *Cereb Cortex*.
- Aldini, G. (1804) *Essai theorique et experimental sur le galvanisme, avec une serie d'experiences faites en presence des commissaires de l'Institut national de France, et en divers amphitheatres anatomiques de Londres, par Jean Aldini... Avec planches* De l'imprimerie de Fournier Fils.
- Allison, T. & Hume, A. L. (1981) A comparative analysis of short-latency somatosensory evoked potentials in man, monkey, cat, and rat. *Exp Neurol*, 72(3), 592-611.
- Allison, T., McCarthy, G., Wood, C. C., Darcey, T. M., Spencer, D. D. & Williamson, P. D. (1989) Human cortical potentials evoked by stimulation of the median nerve. I. Cytoarchitectonic areas generating short-latency activity. *J Neurophysiol*, 62(3), 694-710.
- Allison, T., Wood, C. C., McCarthy, G. & Spencer, D. D. (1991) Cortical somatosensory evoked potentials. II. Effects of excision of somatosensory or motor cortex in humans and monkeys. *J Neurophysiol*, 66(1), 64-82.
- Ampère, A.-M. (1826) *Théorie des phénomènes électro-dynamiques, uniquement déduite de l'expérience* Méquignon-Marvis.
- Antal, A., Boros, K., Poreisz, C., Chaieb, L., Terney, D. & Paulus, W. (2008) Comparatively weak after-effects of transcranial alternating current stimulation (tACS) on cortical excitability in humans. *Brain Stimul*, 1(2), 97-105.
- Atwood, H. L. & MacKay, W. A. (1989) *Essentials of neurophysiology* Decker.
- Aumann, T. D. & Prut, Y. (2015) Do sensorimotor β -oscillations maintain muscle synergy representations in primary motor cortex? *Trends Neurosci*, 38(2), 77-85.
- Aydin-Abidin, S., Trippe, J., Funke, K., Eysel, U. T. & Benali, A. (2008) High- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain. *Exp Brain Res*, 188(2), 249-61.
- Azanza, M. J. & del Moral, A. (1994) Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog Neurobiol*, 44(6), 517-601.
- Baillet, S., Mosher, J. C. & Leahy, R. M. (2001) Electromagnetic brain mapping. *Signal Processing Magazine, IEEE*, 18(6), 14-30.
- Barker, A. T., Jalinous, R. & Freeston, I. L. (1985) Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*, 1(8437), 1106-7.
- Barnothy, J. M., Barnothy, M. F. & Boszormenyi-Nagy, I. (1956) Influence of a magnetic field upon the leucocytes of the mouse. *Nature*, 177(4508), 577-8.
- Bartholow, R. (1874) Art. I.-Experimental Investigations into the Functions of the Human Brain. *The American Journal of the Medical Sciences*, 66(134), 305-313.
- Bashir, S., Perez, J. M., Horvath, J. C. & Pascual-Leone, A. (2013) Differentiation of motor cortical representation of hand muscles by navigated mapping of optimal TMS current directions in healthy subjects. *J Clin Neurophysiol*, 30(4), 390-5.
- Batsikadze, G., Moliadze, V., Paulus, W., Kuo, M. F. & Nitsche, M. A. (2013) Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *J Physiol*, 591(Pt 7), 1987-2000.
- Begall, S., Cervený, J., Neef, J., Vojtech, O. & Burda, H. (2008) Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36), 13451-5.
- Berger, H. (1929) Über das elektrenkephalogramm des menschen. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 87(1), 527-570.
- Bindman, L. J., Lippold, O. & Redfearn, J. (1962) Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents.
- Blanco, S., Garcia, H., Quiroga, R. Q., Romanelli, L. & Rosso, O. (1995) Stationarity of the EEG series. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 14(4), 395-399.

- Brewer, H. B. (1979) Some preliminary studies of the effects of a static magnetic field on the life cycle of the *Lebistes reticulatus* (guppy). *Biophys J*, 28(2), 305-14.
- Buonomano, D. V. & Merzenich, M. M. (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci*, 21, 149-86.
- Böhmer, A. E., Oses, J. P., Schmidt, A. P., Perón, C. S., Krebs, C. L., Oppitz, P. P., D'Avila, T. T., Souza, D. O., Portela, L. V. & Stefani, M. A. (2011) Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 68(6), 1624-30; discussion 1630-1.
- Cacioppo, J. T., Tassinary, L. G. & Berntson, G. (2007) *Handbook of psychophysiology* Cambridge University Press.
- Calamia, M., Markon, K. & Tranel, D. (2012) Scoring higher the second time around: Meta-analyses of practice effects in neuropsychological assessment. *The Clinical Neuropsychologist*, 26(4), 543-570.
- Caplan, J. B., Madsen, J. R., Raghavachari, S. & Kahana, M. J. (2001) Distinct patterns of brain oscillations underlie two basic parameters of human maze learning. *J Neurophysiol*, 86(1), 368-80.
- Caton, R. (1875) Electrical Currents of the Brain. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 2(4), 610.
- Cavopol, A. V., Wamil, A. W., Holcomb, R. R. & McLean, M. J. (1995) Measurement and analysis of static magnetic fields that block action potentials in cultured neurons. *Bioelectromagnetics*, 16(3), 197-206.
- Chaieb, L., Antal, A. & Paulus, W. (2011) Transcranial alternating current stimulation in the low kHz range increases motor cortex excitability. *Restor Neurol Neurosci*, 29(3), 167-75.
- Chaieb, L., Antal, A., Pisoni, A., Saiote, C., Opitz, A., Ambrus, G. G., Focke, N. & Paulus, W. (2014) Safety of 5 kHz tACS. *Brain Stimul*, 7(1), 92-6.
- Chakeres, D. W., Bornstein, R. & Kangarlou, A. (2003) Randomized comparison of cognitive function in humans at 0 and 8 Tesla. *J Magn Reson Imaging*, 18(3), 342-5.
- Chapman, C. E., Jiang, W. & Lamarre, Y. (1988) Modulation of lemniscal input during conditioned arm movements in the monkey. *Exp Brain Res*, 72(2), 316-34.
- Chen, R., Classen, J., Gerloff, C., Celnik, P., Wassermann, E. M., Hallett, M. & Cohen, L. G. (1997) Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*, 48(5), 1398-403.
- Chen, R., Cros, D., Curra, A., Di Lazzaro, V., Lefaucheur, J. P., Magistris, M. R., Mills, K., Rösler, K. M., Triggs, W. J., Ugawa, Y. & Ziemann, U. (2008) The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clin Neurophysiol*, 119(3), 504-32.
- Cheron, G. & Borenstein, S. (1987) Specific gating of the early somatosensory evoked potentials during active movement. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 67(6), 537-48.
- Cheron, G. & Borenstein, S. (1991) Gating of the early components of the frontal and parietal somatosensory evoked potentials in different sensory-motor interference modalities. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 80(6), 522-30.
- Cheron, G. & Borenstein, S. (1992) Mental movement simulation affects the N30 frontal component of the somatosensory evoked potential. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 84(3), 288-92.
- Cheron, G., Dan, B. & Borenstein, S. (2000) Sensory and motor interfering influences on somatosensory evoked potentials. *J Clin Neurophysiol*, 17(3), 280-94.
- Christoffersen, G. (1997) Habituation: events in the history of its characterization and linkage to synaptic depression. A new proposed kinetic criterion for its identification. *Progress in neurobiology*, 53(1), 45-66.
- Coles, M. & Rugg, M. D. (1995) *Electrophysiology of Mind: Event Related Potentials and Cognition*. New York: Oxford University Press.

- Colgin, L. L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M. B. & Moser, E. I. (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*, 462(7271), 353-7.
- Cooley, J. W. & Tukey, J. W. (1965) An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of computation*, 19(90), 297-301.
- Coots, A., Shi, R. & Rosen, A. D. (2004) Effect of a 0.5-T static magnetic field on conduction in guinea pig spinal cord. *J Neurol Sci*, 222(1-2), 55-7.
- Cracco, R. Q. & Cracco, J. B. (1976) Somatosensory evoked potential in man: far field potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 41(5), 460-6.
- Critchley, M. (1953) The parietal lobes.
- Curio, G., Mackert, B. M., Burghoff, M., Koetitz, R., Abraham-Fuchs, K. & Härer, W. (1994) Localization of evoked neuromagnetic 600 Hz activity in the cerebral somatosensory system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 91(6), 483-7.
- Curio, G., Mackert, B. M., Burghoff, M., Neumann, J., Nolte, G., Scherg, M. & Marx, P. (1997) Somatotopic source arrangement of 600 Hz oscillatory magnetic fields at the human primary somatosensory hand cortex. *Neurosci Lett*, 234(2-3), 131-4.
- de Vocht, F., van Drooge, H., Engels, H. & Kromhout, H. (2006) Exposure, health complaints and cognitive performance among employees of an MRI scanners manufacturing department. *J Magn Reson Imaging*, 23(2), 197-204.
- Desmedt, J. E. & Bourguet, M. (1985) Color imaging of parietal and frontal somatosensory potential fields evoked by stimulation of median or posterior tibial nerve in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 62(1), 1-17.
- Desmedt, J. E. & Cheron, G. (1980) Central somatosensory conduction in man: neural generators and interpeak latencies of the far-field components recorded from neck and right or left scalp and earlobes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 50(5-6), 382-403.
- Desmedt, J. E. & Cheron, G. (1981a) Non-cephalic reference recording of early somatosensory potentials to finger stimulation in adult or aging normal man: differentiation of widespread N18 and contralateral N20 from the prerolandic P22 and N30 components. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 52(6), 553-70.
- Desmedt, J. E. & Cheron, G. (1981b) Prevertebral (oesophageal) recording of subcortical somatosensory evoked potentials in man: the spinal P13 component and the dual nature of the spinal generators. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 52(4), 257-75.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Profice, P., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. & Rothwell, J. C. (1999) Effects of voluntary contraction on descending volleys evoked by transcranial electrical stimulation over the motor cortex hand area in conscious humans. *Exp Brain Res*, 124(4), 525-8.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Profice, P., Saturno, E., Pilato, F., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. & Rothwell, J. C. (1998) Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in conscious humans. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 109(5), 397-401.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Saturno, E., Pilato, F., Insola, A., Mazzone, P., Profice, P., Tonali, P. & Rothwell, J. C. (2001) The effect on corticospinal volleys of reversing the direction of current induced in the motor cortex by transcranial magnetic stimulation. *Exp Brain Res*, 138(2), 268-73.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J. & Geczy, C. L. (2013) Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*, 13(1), 24-57.
- Duane, E. & Haines, P. (2004) Principios de neurociencia. Elsevier SA, España.
- Dworschak, M., Franz, M., Czerny, M., Gorlitzer, M., Blaschek, M., Grubhofer, G. & Haider, W. (2003) Release of neuron-specific enolase and S100 after implantation of cardioverters/defibrillators. *Crit Care Med*, 31(8), 2085-9.
- Emerson, R. G., Seyal, M. & Pedley, T. A. (1984) Somatosensory evoked potentials following median nerve stimulation. I. The cervical components. *Brain*, 107 (Pt 1), 169-82.

- Enomoto, H., Ugawa, Y., Hanajima, R., Yuasa, K., Mochizuki, H., Terao, Y., Shiio, Y., Furubayashi, T., Iwata, N. K. & Kanazawa, I. (2001) Decreased sensory cortical excitability after 1 Hz rTMS over the ipsilateral primary motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 112(11), 2154-8.
- Epstein, C. (1997) Technical aspects of EEG: an overview. *The treatment of epilepsy: principles and practice*, 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Feldman, D. E. (2009) Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci*, 32, 33-55.
- Ferbert, A., Priori, A., Rothwell, J. C., Day, B. L., Colebatch, J. G. & Marsden, C. D. (1992) Interhemispheric inhibition of the human motor cortex. *J Physiol*, 453, 525-46.
- Fernández, T., Harmony, T., Rodríguez, M., Bernal, J., Silva, J., Reyes, A. & Marosi, E. (1995) EEG activation patterns during the performance of tasks involving different components of mental calculation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 94(3), 175-82.
- Ferrier, D. (1873) Experimental researches in cerebral physiology and pathology. *Journal of anatomy and physiology*, 8(Pt 1), 152.
- Feurra, M., Paulus, W., Walsh, V. & Kanai, R. (2011) Frequency specific modulation of human somatosensory cortex. *Front Psychol*, 2, 13.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E. & McHugh, P. R. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3), 189-98.
- Fregni, F., Boggio, P. S., Lima, M. C., Ferreira, M. J., Wagner, T., Rigonatti, S. P., Castro, A. W., Souza, D. R., Riberto, M., Freedman, S. D., Nitsche, M. A. & Pascual-Leone, A. (2006) A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain*, 122(1-2), 197-209.
- Fregni, F. & Pascual-Leone, A. (2007) Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nat Clin Pract Neurol*, 3(7), 383-93.
- Fries, P., Reynolds, J. H., Rorie, A. E. & Desimone, R. (2001) Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science*, 291(5508), 1560-3.
- Fritsch, G. & Hitzig, E. (1870) On the electrical excitability of the cerebrum. *Brain and behaviour*, 2.
- Galvani, L. & Aldini, G. (1792) *De Viribus Electricitatis In Motu Musculari Comentarium Cum Joannis Aldini Dissertatione Et Notis; Accesserunt Epistolae ad animalis electricitatis theoriam pertinentes* Apud Societatem Typographicam.
- Gerloff, C., Cohen, L. G., Floeter, M. K., Chen, R., Corwell, B. & Hallett, M. (1998) Inhibitory influence of the ipsilateral motor cortex on responses to stimulation of the human cortex and pyramidal tract. *J Physiol*, 510 (Pt 1), 249-59.
- Gilbert, W. (1958) *De magnete* Courier Corporation.
- Gobbelé, R., Buchner, H. & Curio, G. (1998) High-frequency (600 Hz) SEP activities originating in the subcortical and cortical human somatosensory system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 108(2), 182-9.
- Gonzalez-Rosa, J. J., Soto-Leon, V., Real, P., Carrasco-Lopez, C., Foffani, G., Strange, B. A. & Oliviero, A. (2015) Static Magnetic Field Stimulation over the Visual Cortex Increases Alpha Oscillations and Slows Visual Search in Humans. *J Neurosci*, 35(24), 9182-93.
- Groves, P. M. & Thompson, R. F. (1970) Habituation: a dual-process theory. *Psychological review*, 77(5), 419.
- Guerra, P. A., Gegear, R. J. & Reppert, S. M. (2014) A magnetic compass aids monarch butterfly migration. *Nat Commun*, 5, 4164.
- Halliday, A. M. (1993) *Evoked potentials in clinical testing* Churchill Livingstone.
- Hamada, M., Hanajima, R., Terao, Y., Arai, N., Furubayashi, T., Inomata-Terada, S., Yugeta, A., Matsumoto, H., Shirota, Y. & Ugawa, Y. (2007) Quadro-pulse stimulation is more effective than paired-pulse stimulation for plasticity induction of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 118(12), 2672-82.

- Hamada, M., Terao, Y., Hanajima, R., Shirota, Y., Nakatani-Enomoto, S., Furubayashi, T., Matsumoto, H. & Ugawa, Y. (2008) Bidirectional long-term motor cortical plasticity and metaplasticity induced by quadripulse transcranial magnetic stimulation. *J Physiol*, 586(16), 3927-47.
- Hanslmayr, S., Aslan, A., Staudigl, T., Klimesch, W., Herrmann, C. S. & Bäuml, K. H. (2007) Prestimulus oscillations predict visual perception performance between and within subjects. *Neuroimage*, 37(4), 1465-73.
- Hashimoto, I., Kimura, T., Fukushima, T., Iguchi, Y., Saito, Y., Terasaki, O. & Sakuma, K. (1999) Reciprocal modulation of somatosensory evoked N20m primary response and high-frequency oscillations by interference stimulation. *Clin Neurophysiol*, 110(8), 1445-51.
- Hashimoto, I., Mashiko, T. & Imada, T. (1996) Somatic evoked high-frequency magnetic oscillations reflect activity of inhibitory interneurons in the human somatosensory cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 100(3), 189-203.
- Herrmann, M., Vos, P., Wunderlich, M. T., de Bruijn, C. H. & Lamers, K. J. (2000) Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*, 31(11), 2670-7.
- Hiscock, H. G., Worster, S., Kattinig, D. R., Steers, C., Jin, Y., Manolopoulos, D. E., Mouritsen, H. & Hore, P. J. (2016) The quantum needle of the avian magnetic compass. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hong, C. Z., Huestis, P., Thompson, R. & Yu, J. (1988) Learning ability of young rats is unaffected by repeated exposure to a static electromagnetic field in early life. *Bioelectromagnetics*, 9(3), 269-73.
- Huang, Y. Z., Edwards, M. J., Rounis, E., Bhatia, K. P. & Rothwell, J. C. (2005) Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron*, 45(2), 201-6.
- Huang, Y. Z. & Rothwell, J. C. (2004) The effect of short-duration bursts of high-frequency, low-intensity transcranial magnetic stimulation on the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 115(5), 1069-75.
- Hume, A. L. & Cant, B. R. (1978) Conduction time in central somatosensory pathways in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 45(3), 361-75.
- Häfelí, U. (1998) The history of magnetism in medicine. *Magnetism in Medicine: A Handbook, Second Edition*, 1-25.
- Jasper, H. H. (1958) The ten twenty electrode system of the international federation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 10, 371-375.
- Jensen, O., Gelfand, J., Kounios, J. & Lisman, J. E. (2002) Oscillations in the alpha band (9-12 Hz) increase with memory load during retention in a short-term memory task. *Cereb Cortex*, 12(8), 877-82.
- Johnsen, S. & Lohmann, K. J. (2005) The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nat Rev Neurosci*, 6(9), 703-12.
- Jones, E. (1983) The columnar basis of cortical circuitry. *The clinical neurosciences*, 5, 257-383.
- Jones, M. S. & Barth, D. S. (2002) Effects of bicuculline methiodide on fast (>200 Hz) electrical oscillations in rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol*, 88(2), 1016-25.
- Jones, M. S., MacDonald, K. D., Choi, B., Dudek, F. E. & Barth, D. S. (2000) Intracellular correlates of fast (>200 Hz) electrical oscillations in rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol*, 84(3), 1505-18.
- Jones, S. R., Pritchett, D. L., Stufflebeam, S. M., Hämäläinen, M. & Moore, C. I. (2007) Neural correlates of tactile detection: a combined magnetoencephalography and biophysically based computational modeling study. *J Neurosci*, 27(40), 10751-64.
- Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P., Burghuber, O. & Worofka, W. (1989) Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta*, 183(1), 13-31.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (2000) *Principles of neural science*, 4McGraw-Hill New York.

- Kangarlu, A., Burgess, R. E., Zhu, H., Nakayama, T., Hamlin, R. L., Abduljalil, A. M. & Robitaille, P. M. (1999) Cognitive, cardiac, and physiological safety studies in ultra high field magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*, 17(10), 1407-16.
- Katayama, T., Suppa, A. & Rothwell, J. C. (2010) Somatosensory evoked potentials and high frequency oscillations are differently modulated by theta burst stimulation over primary somatosensory cortex in humans. *Clin Neurophysiol*, 121(12), 2097-103.
- Kimura, J. (2013) *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice* Oxford university press.
- Kirimoto, H., Tamaki, H., Matsumoto, T., Sugawara, K., Suzuki, M., Oyama, M. & Onishi, H. (2014) Effect of transcranial static magnetic field stimulation over the sensorimotor cortex on somatosensory evoked potentials in humans. *Brain Stimul*, 7(6), 836-40.
- Klimesch, W. (1996) Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization. *Int J Psychophysiol*, 24(1-2), 61-100.
- Klimesch, W. (1997) EEG-alpha rhythms and memory processes. *Int J Psychophysiol*, 26(1-3), 319-40.
- Klimesch, W. (1999) EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev*, 29(2-3), 169-95.
- Klimesch, W., Doppelmayr, M., Pachinger, T. & Russegger, H. (1997) Event-related desynchronization in the alpha band and the processing of semantic information. *Brain Res Cogn Brain Res*, 6(2), 83-94.
- Klimesch, W., Doppelmayr, M., Yonelinas, A., Kroll, N. E., Lazzara, M., Röhm, D. & Gruber, W. (2001) Theta synchronization during episodic retrieval: neural correlates of conscious awareness. *Brain Res Cogn Brain Res*, 12(1), 33-8.
- Klimesch, W., Sauseng, P. & Gerloff, C. (2003) Enhancing cognitive performance with repetitive transcranial magnetic stimulation at human individual alpha frequency. *Eur J Neurosci*, 17(5), 1129-33.
- Klimesch, W., Sauseng, P. & Hanslmayr, S. (2007) EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain Res Rev*, 53(1), 63-88.
- Klostermann, F., Gobbels, R., Buchner, H. & Curio, G. (2002) Intrathalamic non-propagating generators of high-frequency (1000 Hz) somatosensory evoked potential (SEP) bursts recorded subcortically in man. *Clin Neurophysiol*, 113(7), 1001-5.
- Kobayashi, M. & Pascual-Leone, A. (2003) Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol*, 2(3), 145-56.
- Kujirai, K., Kujirai, T., Sinkjaer, T. & Rothwell, J. C. (2006) Associative plasticity in human motor cortex during voluntary muscle contraction. *J Neurophysiol*, 96(3), 1337-46.
- Kujirai, T., Caramia, M. D., Rothwell, J. C., Day, B. L., Thompson, P. D., Ferbert, A., Wroe, S., Asselman, P. & Marsden, C. D. (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol*, 471, 501-19.
- Kübler, A., Kotchoubey, B., Kaiser, J., Wolpaw, J. R. & Birbaumer, N. (2001) Brain-computer communication: Unlocking the locked in. *Psychological bulletin*, 127(3), 358.
- Lefaucheur, J. P., André-Obadia, N., Antal, A., Ayache, S. S., Baeken, C., Benninger, D. H., Cantello, R. M., Cincotta, M., de Carvalho, M., De Ridder, D., Devanne, H., Di Lazzaro, V., Filipović, S. R., Hummel, F. C., Jääskeläinen, S. K., Kimiskidis, V. K., Koch, G., Langguth, B., Nyffeler, T., Oliviero, A., Padberg, F., Poulet, E., Rossi, S., Rossini, P. M., Rothwell, J. C., Schönfeldt-Lecuona, C., Siebner, H. R., Slotema, C. W., Stagg, C. J., Valls-Sole, J., Ziemann, U., Paulus, W. & Garcia-Larrea, L. (2014) Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clin Neurophysiol*, 125(11), 2150-206.
- Lefaucheur, J. P., Drouot, X. & Nguyen, J. P. (2001) Interventional neurophysiology for pain control: duration of pain relief following repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Neurophysiol Clin*, 31(4), 247-52.

- Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F. & Paulus, W. (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain*, 125(Pt 10), 2238-47.
- Linkenkaer-Hansen, K., Nikulin, V. V., Palva, S., Ilmoniemi, R. J. & Palva, J. M. (2004) Prestimulus oscillations enhance psychophysical performance in humans. *J Neurosci*, 24(45), 10186-90.
- Lorentz, H. A. (1937) *Electromagnetic phenomena in a system moving with any velocity smaller than that of light* Springer.
- Lueders, H., Lesser, R., Hahn, J., Little, J. & Klem, G. (1983a) Subcortical somatosensory evoked potentials to median nerve stimulation. *Brain*, 106 (Pt 2), 341-72.
- Lueders, H., Lesser, R. P., Hahn, J., Dinner, D. S. & Klem, G. (1983b) Cortical somatosensory evoked potentials in response to hand stimulation. *J Neurosurg*, 58(6), 885-94.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Fernández, C. R. & Pérez, M. S. (2004) *Brock Biología de los microorganismos*, 10SciELO Espana.
- Maeda, F., Keenan, J. P., Tormos, J. M., Topka, H. & Pascual-Leone, A. (2000) Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol*, 111(5), 800-5.
- Maret, G. & Dransfeld, K. (1985) Biomolecules and polymers in high steady magnetic fields, *Strong and Ultrastrong Magnetic Fields and Their Applications* Springer, 143-204.
- Mathiowetz, V., Volland, G., Kashman, N. & Weber, K. (1985) Adult norms for the Box and Block Test of manual dexterity. *Am J Occup Ther*, 39(6), 386-91.
- Mauguière, F. & Courjon, J. (1981) The origins of short-latency somatosensory evoked potentials in humans. *Ann Neurol*, 9(6), 607-11.
- Mauguière, F., Desmedt, J. E. & Courjon, J. (1983a) Astereognosis and dissociated loss of frontal or parietal components of somatosensory evoked potentials in hemispheric lesions. Detailed correlations with clinical signs and computerized tomographic scanning. *Brain*, 106 (Pt 2), 271-311.
- Mauguière, F., Desmedt, J. E. & Courjon, J. (1983b) Neural generators of N18 and P14 far-field somatosensory evoked potentials studied in patients with lesion of thalamus or thalamo-cortical radiations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 56(4), 283-92.
- Maxwell, J. C. (1863) A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Proceedings of the Royal Society of London*, 13, 531-536.
- McLean, M. J., Engström, S., Holcomb, R. R. & Sanchez, D. (2003) A static magnetic field modulates severity of audiogenic seizures and anticonvulsant effects of phenytoin in DBA/2 mice. *Epilepsy Res*, 55(1-2), 105-16.
- McLean, M. J., Engström, S., Qinkun, Z., Spankovich, C., Polley, D. B. & Polley, D. (2008) Effects of a static magnetic field on audiogenic seizures in black Swiss mice. *Epilepsy Res*, 80(2-3), 119-31.
- Merton, P. A. & Morton, H. B. (1980) Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*, 285(5762), 227.
- Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C. & Kaps, M. (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*, 28(10), 1956-60.
- Moliadze, V., Atalay, D., Antal, A. & Paulus, W. (2012) Close to threshold transcranial electrical stimulation preferentially activates inhibitory networks before switching to excitation with higher intensities. *Brain Stimul*, 5(4), 505-11.
- Monto, S., Palva, S., Voipio, J. & Palva, J. M. (2008) Very slow EEG fluctuations predict the dynamics of stimulus detection and oscillation amplitudes in humans. *J Neurosci*, 28(33), 8268-72.
- Morrish, A. H. (2001) The physical principles of magnetism. *The Physical Principles of Magnetism*, by Allan H. Morrish, pp. 696. ISBN 0-7803-6029-X. Wiley-VCH, January 2001., 1.

- Niedermeyer, E. & da Silva, F. L. (2005) *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields* Lippincott Williams & Wilkins.
- Nitsche, M. A., Fricke, K., Henschke, U., Schlitterlau, A., Liebetanz, D., Lang, N., Henning, S., Tergau, F. & Paulus, W. (2003a) Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol*, 553(Pt 1), 293-301.
- Nitsche, M. A., Liebetanz, D., Schlitterlau, A., Henschke, U., Fricke, K., Frommann, K., Lang, N., Henning, S., Paulus, W. & Tergau, F. (2004) GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. *Eur J Neurosci*, 19(10), 2720-6.
- Nitsche, M. A., Nitsche, M. S., Klein, C. C., Tergau, F., Rothwell, J. C. & Paulus, W. (2003b) Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 114(4), 600-4.
- Nitsche, M. A. & Paulus, W. (2000) Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*, 527 Pt 3, 633-9.
- Nojima, I., Koganemaru, S., Fukuyama, H. & Mima, T. (2015) Static magnetic field can transiently alter the human intracortical inhibitory system. *Clin Neurophysiol*, 126(12), 2314-9.
- Nyquist, H. (1928) Certain topics in telegraph transmission theory. *American Institute of Electrical Engineers, Transactions of the*, 47(2), 617-644.
- Oersted, H. C. (1820) Electricity and magnetic needles. *Philosophy*, 16(4), 273-276.
- Oliviero, A., Carrasco-López, M. C., Campolo, M., Perez-Borrego, Y. A., Soto-León, V., Gonzalez-Rosa, J. J., Higuero, A. M., Strange, B. A., Abad-Rodriguez, J. & Foffani, G. (2014) Safety Study of Transcranial Static Magnetic Field Stimulation (tSMS) of the Human Cortex. *Brain Stimul*.
- Oliviero, A., Mordillo-Mateos, L., Arias, P., Panyavin, I., Foffani, G. & Aguilar, J. (2011) Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol*, 589(Pt 20), 4949-58.
- Ozaki, I., Yaegashi, Y., Kimura, T., Baba, M., Matsunaga, M. & Hashimoto, I. (2001) Dipole orientation differs between high frequency oscillations and N20m current sources in human somatosensory evoked magnetic fields to median nerve stimulation. *Neurosci Lett*, 310(1), 41-4.
- Palva, J. M., Palva, S. & Kaila, K. (2005) Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *J Neurosci*, 25(15), 3962-72.
- Parent, A. (2004) Giovanni Aldini: from animal electricity to human brain stimulation. *Can J Neurol Sci*, 31(4), 576-84.
- Pascual-Leone, A., Davey, N. J., Rothwell, J., Wasserman, E. M. & Puri, B. K. (2002) *Handbook of transcranial magnetic stimulation*, 15 Arnold London.
- Pascual-Leone, A. & Tormos-Muñoz, J. (2008) Estimulación magnética transcraneal: fundamentos y potencial de la modulación de redes neurales específicas. *Rev Neurol*, 46(Supl 1), S3-10.
- Pascual-Leone, A., Valls-Solé, J., Wassermann, E. M. & Hallett, M. (1994) Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain*, 117 (Pt 4), 847-58.
- Pascual-Leone, A., Walsh, V. & Rothwell, J. (2000) Transcranial magnetic stimulation in cognitive neuroscience--virtual lesion, chronometry, and functional connectivity. *Curr Opin Neurobiol*, 10(2), 232-7.
- Patton, H. D. & Amassian, V. E. (1954) Single and multiple-unit analysis of cortical stage of pyramidal tract activation. *J Neurophysiol*, 17(4), 345-63.
- Peeke, H. & Petrinovich, L. (1984) Approaches, constructs, and terminology for the study of response change in the intact organism. *Habituation, sensitization, and behavior*, 1-14.
- Penfield, W. & Boldrey, E. (1937) Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, 60(4), 389-443.
- Penfield, W. & Rasmussen, T. (1950) The cerebral cortex of man; a clinical study of localization of function.
- Pfurtscheller, G. (2001) Functional brain imaging based on ERD/ERS. *Vision Res*, 41(10-11), 1257-60.

- Pfurtscheller, G. (2003) Induced oscillations in the alpha band: functional meaning. *Epilepsia*, 44 Suppl 12, 2-8.
- Picton, T., Bentin, S., Berg, P., Donchin, E., Hillyard, S., Johnson, R., Miller, G., Ritter, W., Ruchkin, D. & Rugg, M. (2000) Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology*, 37(02), 127-152.
- Pineda, J. A. (2005) The functional significance of mu rhythms: translating "seeing" and "hearing" into "doing". *Brain Res Brain Res Rev*, 50(1), 57-68.
- Purpura, D. P. & McMurtry, J. G. (1965) Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 28(1), 166-185.
- Ranieri, F., Podda, M. V., Riccardi, E., Frisullo, G., Dileone, M., Profice, P., Pilato, F., Di Lazzaro, V. & Grassi, C. (2012) Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. *J Neurophysiol*, 107(7), 1868-80.
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F. & Thompson, R. F. (2009) Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*, 92(2), 135-8.
- Ray, W. J. & Cole, H. W. (1985) EEG alpha activity reflects attentional demands, and beta activity reflects emotional and cognitive processes. *Science*, 228(4700), 750-2.
- Regan, D. (1989) Human brain electrophysiology: evoked potentials and evoked magnetic fields in science and medicine.
- Restuccia, D., Del Piero, I., Martucci, L. & Zanini, S. (2011) High-frequency oscillations after median-nerve stimulation do not undergo habituation: a new insight on their functional meaning? *Clin Neurophysiol*, 122(1), 148-52.
- Restuccia, D., Ulivelli, M., De Capua, A., Bartalini, S. & Rossi, S. (2007) Modulation of high-frequency (600 Hz) somatosensory-evoked potentials after rTMS of the primary sensory cortex. *Eur J Neurosci*, 26(8), 2349-58.
- Restuccia, D., Vollono, C., Viridis, D., del Piero, I., Martucci, L. & Zanini, S. (2014) Patterns of habituation and clinical fluctuations in migraine. *Cephalalgia*, 34(3), 201-10.
- Ridding, M. C. & Rothwell, J. C. (1997) Stimulus/response curves as a method of measuring motor cortical excitability in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 105(5), 340-4.
- Rioul, O. & Vetterli, M. (1991) Wavelets and signal processing. *IEEE signal processing magazine*, 8(LCAV-ARTICLE-1991-005), 14-38.
- Ritz, T., Thalau, P., Phillips, J. B., Wiltschko, R. & Wiltschko, W. (2004) Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature*, 429(6988), 177-80.
- Rivadulla, C., Foffani, G. & Oliviero, A. (2014) Magnetic field strength and reproducibility of neodymium magnets useful for transcranial static magnetic field stimulation of the human cortex. *Neuromodulation*, 17(5), 438-41; discussion 441-2.
- Roberts, A. M. (1970) Motion of Paramecium in static electric and magnetic fields. *J Theor Biol*, 27(1), 97-106.
- Roberts, D. C., Marcelli, V., Gillen, J. S., Carey, J. P., Della Santina, C. C. & Zee, D. S. (2011) MRI magnetic field stimulates rotational sensors of the brain. *Curr Biol*, 21(19), 1635-40.
- Rodriguez, E., George, N., Lachaux, J. P., Martinerie, J., Renault, B. & Varela, F. J. (1999) Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature*, 397(6718), 430-3.
- Rogalewski, A., Breitenstein, C., Nitsche, M. A., Paulus, W. & Knecht, S. (2004) Transcranial direct current stimulation disrupts tactile perception. *Eur J Neurosci*, 20(1), 313-6.
- Romei, V., Gross, J. & Thut, G. (2010) On the role of prestimulus alpha rhythms over occipito-parietal areas in visual input regulation: correlation or causation? *J Neurosci*, 30(25), 8692-7.
- Rosen, A. D. (1993) Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. *Biochim Biophys Acta*, 1148(2), 317-20.
- Rosen, A. D. (1996) Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochim Biophys Acta*, 1282(1), 149-55.

- Rosen, A. D. (2003a) Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na⁺ channels in GH3 cells. *Bioelectromagnetics*, 24(7), 517-23.
- Rosen, A. D. (2003b) Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys*, 39(2), 163-73.
- Rosen, A. D. & Lubowsky, J. (1987) Magnetic field influence on central nervous system function. *Exp Neurol*, 95(3), 679-87.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. & Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*, 60(6), 614-32.
- Schaarschmidt, H., Prange, H. W. & Reiber, H. (1994) Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke*, 25(3), 558-65.
- Schaul, N. (1998) The fundamental neural mechanisms of electroencephalography. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 106(2), 101-7.
- Scherg, M. & Von Cramon, D. (1986) Evoked dipole source potentials of the human auditory cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 65(5), 344-60.
- Schiff, H. (1991) Modulation of spike frequencies by varying the ambient magnetic field and magnetite candidates in bees (*Apis mellifera*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 100(4), 975-85.
- Siebner, H. R. & Rothwell, J. (2003) Transcranial magnetic stimulation: new insights into representational cortical plasticity. *Exp Brain Res*, 148(1), 1-16.
- Silbert, B. I., Pevcic, D. D., Patterson, H. I., Windnagel, K. A. & Thickbroom, G. W. (2013) Inverse correlation between resting motor threshold and corticomotor excitability after static magnetic stimulation of human motor cortex. *Brain Stimul*, 6(5), 817-20.
- Singer, W. (1999) Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron*, 24(1), 49-65, 111-25.
- Stefan, K., Kunesch, E., Benecke, R., Cohen, L. G. & Classen, J. (2002) Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol*, 543(Pt 2), 699-708.
- Stefan, K., Kunesch, E., Cohen, L. G., Benecke, R. & Classen, J. (2000) Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain*, 123 Pt 3, 572-84.
- Terney, D., Chaieb, L., Moliadze, V., Antal, A. & Paulus, W. (2008) Increasing human brain excitability by transcranial high-frequency random noise stimulation. *J Neurosci*, 28(52), 14147-55.
- Thompson, R. F. & Spencer, W. A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, 73(1), 16.
- Thut, G., Nietzel, A., Brandt, S. A. & Pascual-Leone, A. (2006) Alpha-band electroencephalographic activity over occipital cortex indexes visuospatial attention bias and predicts visual target detection. *J Neurosci*, 26(37), 9494-502.
- Tokimura, H., Di Lazzaro, V., Tokimura, Y., Oliviero, A., Profice, P., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. & Rothwell, J. C. (2000) Short latency inhibition of human hand motor cortex by somatosensory input from the hand. *J Physiol*, 523 Pt 2, 503-13.
- Tomborg, C., Desmedt, J. E., Ozaki, I. & Noël, P. (1991) Nasopharyngeal recordings of somatosensory evoked potentials document the medullary origin of the N18 far-field. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 80(6), 496-503.
- Triggs, W. J., Macdonell, R. A., Cros, D., Chiappa, K. H., Shahani, B. T. & Day, B. J. (1992) Motor inhibition and excitation are independent effects of magnetic cortical stimulation. *Ann Neurol*, 32(3), 345-51.
- Ullrich, H., Kranaster, L., Sigges, E., Andrich, J. & Sartorius, A. (2013) Neuron specific enolase and serum remain unaffected by ultra high frequency left prefrontal transcranial magnetic stimulation in patients with depression: a preliminary study. *J Neural Transm (Vienna)*, 120(12), 1733-6.
- Usakli, A. B. (2010) Improvement of EEG signal acquisition: an electrical aspect for state of the art of front end. *Comput Intell Neurosci*, 630649.

- Valls-Solé, J., Pascual-Leone, A., Wassermann, E. M. & Hallett, M. (1992) Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 85(6), 355-64.
- Vertesi, A., Lever, J. A., Molloy, D. W., Sanderson, B., Tuttle, I., Pokoradi, L. & Principi, E. (2001) Standardized Mini-Mental State Examination. Use and interpretation. *Canadian Family Physician*, 47(10), 2018-2023.
- Vidal-Gadea, A., Ward, K., Beron, C., Ghorashian, N., Gokce, S., Russell, J., Truong, N., Parikh, A., Gadea, O., Ben-Yakar, A. & Pierce-Shimomura, J. (2015) Magnetosensitive neurons mediate geomagnetic orientation in *Caenorhabditis elegans*. *Elife*, 4.
- Vossen, A., Gross, J. & Thut, G. (2015) Alpha Power Increase After Transcranial Alternating Current Stimulation at Alpha Frequency (α -tACS) Reflects Plastic Changes Rather Than Entrainment. *Brain Stimul*, 8(3), 499-508.
- Wassermann, E. M., McShane, L. M., Hallett, M. & Cohen, L. G. (1992) Noninvasive mapping of muscle representations in human motor cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 85(1), 1-8.
- Waterstraat, G., Fedele, T., Burghoff, M., Scheer, H. J. & Curio, G. (2015) Recording human cortical population spikes non-invasively - An EEG tutorial. *J Neurosci Methods*, 250, 74-84.
- Wieraszko, A. (2000) Dantrolene modulates the influence of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. *Bioelectromagnetics*, 21(3), 175-82.
- Wiethoff, S., Hamada, M. & Rothwell, J. C. (2014) Variability in response to transcranial direct current stimulation of the motor cortex. *Brain Stimul*, 7(3), 468-75.
- Wikswow, J. P. & Barach, J. P. (1980) An estimate of the steady magnetic field strength required to influence nerve conduction. *IEEE Trans Biomed Eng*, 27(12), 722-3.
- Wu, L. Q. & Dickman, J. D. (2012) Neural correlates of a magnetic sense. *Science*, 336(6084), 1054-7.
- Yardan, T., Cevik, Y., Donderici, O., Kavalci, C., Yilmaz, F. M., Yilmaz, G., Vural, K., Yuzbasioglu, Y., Gunaydin, Y. K. & Sezer, A. A. (2009) Elevated serum S100B protein and neuron-specific enolase levels in carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med*, 27(7), 838-42.
- Young, W. & Gofman, J. W. (1965) *Magnetic Fields, Vagal Inhibition, and Acetylcholinesterase Activity*.
- Zaehle, T., Rach, S. & Herrmann, C. S. (2010) Transcranial alternating current stimulation enhances individual alpha activity in human EEG. *PLoS One*, 5(11), e13766.
- Zago, S., Ferrucci, R., Fregni, F. & Priori, A. (2008) Bartholow, Sciamanna, Alberti: pioneers in the electrical stimulation of the exposed human cerebral cortex. *Neuroscientist*, 14(5), 521-8.
- Ziemann, U. (2004) TMS induced plasticity in human cortex. *Rev Neurosci*, 15(4), 253-66.

Anexo

Exp. 4: Estudio control

Se evaluaron los efectos de un SMS sobre el nervio mediano con el registro de potenciales de acción sensoriales (SAPs) evocados con estimulación eléctrica periférica. Los registros se llevaron a cabo con dos metodologías distintas. El primer protocolo (Exp. 4.1) fue diseñado para investigar los posibles efectos de los SMS en la amplitud de los SAPs. Por otro lado, el segundo experimento (Exp. 4.2) fue programado para evaluar los posibles efectos de un SMS en una frecuencia artificial de 8 Hz en los SAPs (se modificó la metodología del Exp. 4.1 para obtener 8 Hz como frecuencia de estimulación).

Sujetos

Exp. 4.1: los registros fueron obtenidos de 10 nervios medianos de 5 voluntarios sanos (4 mujeres; edad media 36.4 años; SD 7.4).

Exp. 4.2: los sujetos fueron un total de 5 voluntarios sanos, registrando 8 nervios medianos (5 mujeres; edad media 35.6 años; SD 6.2).

Diseño experimental

La estimulación eléctrica de ambos experimentos fue realizada con electrodos de anillas colocados en el tercer dedo de la mano (dedo corazón) utilizando gel como conductor eléctrico. El cátodo fue posicionado de manera proximal mientras que el ánodo se situó distalmente en la falange del mismo dedo a 2 cm de distancia. El estímulo eléctrico consistió en un pulso rectangular de 0.2 ms de duración. La intensidad del estímulo fue escogida para registrar una amplitud del SAP ligeramente submaximal y, por tanto, optimizar las posibilidades de observar los cambios de amplitud. Los registros de SAPs fueron realizados con dos electrodos localizados sobre el nervio mediano a la altura de la muñeca. Durante la línea de base un placebo fue colocado sobre los electrodos de registro y posteriormente sustituido por el SMS durante los otros dos bloques de estimulación.

- **Exp. 4.1.** La frecuencia de estimulación elegida fue de 0.4 Hz. Se realizó un registro de 15 min en el que se diferenciaron tres bloques: 1) línea de base; 2) estimulación con SMS; 3) estimulación con SMS, todos ellos de 300 s. En cada bloque por tanto se evocaron 120 respuestas. En este experimento se utilizaron electrodos de registro de copa de plata clorhídrica. Los SAPs se promediaron en bloques de 300 s y se analizó la amplitud pico a pico del potencial (**Fig. 34**).

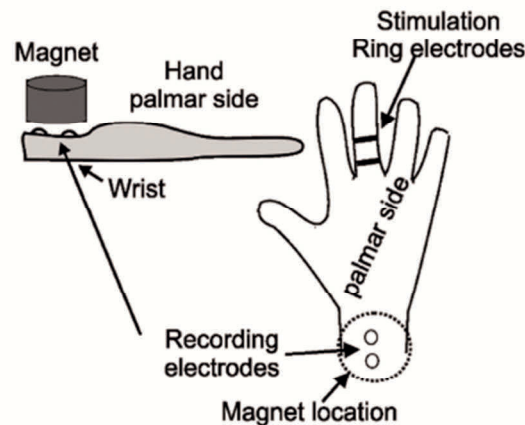


Fig. 34 Diseño experimental del Exp. 4.1.

La estimulación con SMS se colocó a nivel periférico sobre el nervio mediano, justo encima de los electrodo de registro (electrodos de copa), mientras a nivel del tercer dedo se estimó eléctricamente los SAPs con electrodos de anillo. Se encuentra representada la visión lateral (derecha) y palmar (izquierda) de la mano.

- **Exp. 4.2.** La localización de los electrodos de registro en este experimento fue idéntica que en el protocolo anterior. Sin embargo, los electrodos fueron los mismos con los que se realizó el EEG. El protocolo constó de: 1) línea de base de 10 min; 2) periodo de estimulación con SMS de 10 min. La estimulación eléctrica se realizó en trenes de 40 estímulos a 8 Hz (5 s) seguidos de 30 s de pausa. Estos trenes se repitieron 17 veces por bloque, y se evocaron un total de 680 potenciales. Además de promediar los potenciales para obtener el valor de la amplitud del potencial, también se calculó el espectro de frecuencia de la señal. Para ello fue necesaria la interpolación del artefacto de estímulo antes de realizar el análisis de frecuencia (**Fig. 35**).

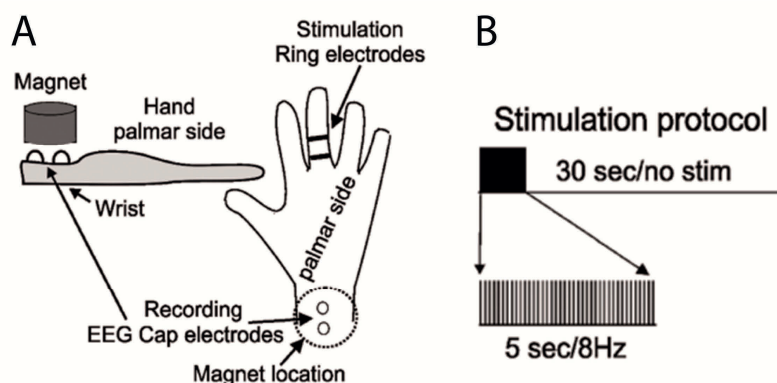


Fig. 35 Diseño experimental del Exp. 4.2.

A) Visión lateral (derecha) y palmar (izquierda) de la mano mostrando la colocación del imán, los electrodos de registro y los de estimulación periférica. En este caso, los electrodos de registro eran los electrodos del EEG. **B)** Protocolo de estimulación eléctrica fue en pulsos de 5 s con una frecuencia de 8 Hz un total de 17 trenes con 30 s de pausas entre cada tren.

Análisis de datos

Todos los tests estadísticos realizados en estos experimentos fueron t test para muestras pareadas (Real VS Placebo).

- **Exp. 4.1.** Se comparó la diferencia en la amplitud del potencial entre la línea de base y los bloques con SMS.
- **Exp. 4.2.** Al igual que en el protocolo anterior, se calculó la amplitud del potencial en cada uno de los dos bloques. No obstante, también se realizó un análisis de frecuencia, el cual consistió en calcular un espectro de frecuencia de los 17 trenes para la línea de base y para el período de estimulación con SMS. Este espectro de frecuencia mostró de manera artificial las oscilaciones inducidas a 8 Hz.

Resultados

En el Exp. 4.1 no se observó ninguna diferencia en la amplitud de los potenciales SAPs comparando los tres diferentes bloques entre la línea de base y la estimulación con SMS (*t-test* de muestras pareadas $p > 0.05$ **Fig. 36**).

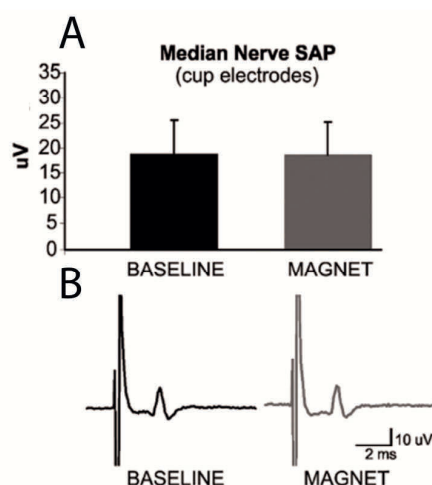


Fig. 36 Resultados del Exp. 4.1

A) Amplitud del potencial (μV) registrado con electrodos de copa evocados tras la estimulación periférica durante la línea de base y la estimulación magnética. **B)** Ejemplo de un potencial en un sujeto representativo durante la línea de base y la SMS. No se observaron diferencias en la amplitud del potencial en los diferentes tiempos de registro.

Además, estos resultados negativos fueron también replicados en el Exp. 4.2, no encontrando diferencia en la amplitud del potencial entre la línea de base y el bloque con SMS (*t-test* de muestras pareadas $p > 0.05$; **Fig. 37**). Asimismo, el análisis de frecuencia relevó que no existían cambios en la amplitud del espectro de frecuencia.

Este resultado excluyó la posibilidad de que la modulación de la frecuencia α 2 del grupo real en el Exp. 2 fuese debida a un efecto interferencia/ruido del imán sobre el registro de la frecuencia a 8 Hz (*t-test* de muestras pareadas $p>0.05$; **Fig. 37**).

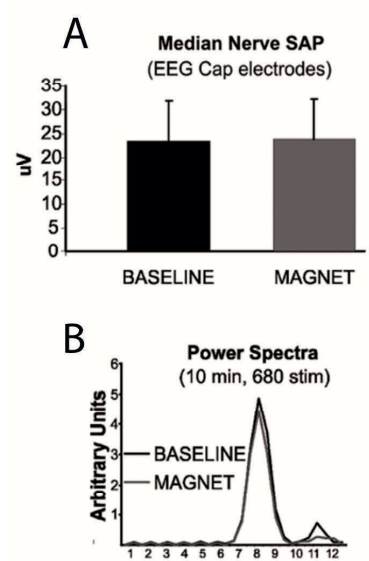


Fig. 37 Resultados del Exp. 4.2

A) Amplitud del potencial (μV) registrado con electrodos de EEG durante la línea de base y la estimulación magnética. **B)** Gran promedio del espectro de frecuencia mostrando la frecuencia inducida a 8 Hz. No se observaron cambios en las dos medidas (potenciales y frecuencia) analizadas.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Stimulation

journal homepage: www.brainstimjrn.com

Original Research

Safety Study of Transcranial Static Magnetic Field Stimulation (tSMS) of the Human Cortex

A. Oliviero^{a,*}, M.C. Carrasco-López^a, M. Campolo^a, Y.A. Perez-Borrego^a, V. Soto-León^a, J.J. Gonzalez-Rosa^b, A.M. Higuero^c, B.A. Strange^b, J. Abad-Rodriguez^c, G. Foffani^{d,e,**}^a FENNSI Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain^b Laboratory for Clinical Neuroscience, CTB, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain^c Membrane Biology and Axonal Repair Lab, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain^d Neurosignals Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain^e CINAC, HM Puerta del Sur, Hospitales de Madrid Mostoles and CEU San Pablo University, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2014

Received in revised form

2 December 2014

Accepted 5 December 2014

Available online xxx

Keywords:

NIBS

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS)

Safety

Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS)

Neuron-specific enolase

S100

ABSTRACT

Background: Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) in humans reduces cortical excitability. **Objective:** The objective of this study was to determine if prolonged tSMS (2 h) could be delivered safely in humans. Safety limits for this technique have not been described.

Methods: tSMS was applied for 2 h with a cylindric magnet on the occiput of 17 healthy subjects. We assessed tSMS-related safety aspects at tissue level by measuring levels of neuron-specific enolase (NSE, a marker of neuronal damage) and S100 (a marker of glial reactivity and damage). We also included an evaluation of cognitive side effects by using a battery of visuomotor and cognitive tests.

Results: tSMS did not induce any significant increase in NSE or S100. No cognitive alteration was detected. **Conclusions:** Our data indicate that the application of tSMS is safe in healthy human subjects, at least within these parameters.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Non-invasive brain stimulation (NIBS) techniques have made an important contribution to cognitive neuroscience and have been proposed as a treatment for neuropsychiatric disorders [1]. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS) are commonly used for NIBS in

humans and animals. Recently we described that the application of transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) in humans reduces the output of motor cortex – tested using TMS – for a few minutes after the end of stimulation [2]. Reduced motor output after tSMS can be explained by reduced motor cortex excitability. These results have been recently replicated by a different group [3]. tSMS using small magnets may thus be a promising tool to modulate cerebral excitability in a non-invasive, painless and reversible way.

Static magnetic fields, unlike time-varying magnetic fields, are not associated with induced electric currents and have been shown to influence a variety of biological systems [4]. A number of studies suggest that static magnetic fields act primarily at the synapse and alter the function of membrane ion channels [5], and the application of static magnetic fields to different animal preparations seem to have an effect that outlasts the time of stimulation [6]. When tSMS is applied in humans, the cortex is at least 2 cm away, so most of the strength of the magnetic field will not reach the target. The recommended limits by the World Health Organization (WHO) about safe exposure to static magnet fields are “time weighted average of 200 mT during the working day for occupational

This research was funded by the “Ministerio de Economía y Competitividad” of Spain (project: SAF2012-39589) co-funded by the “Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER” and partly supported by the “Michael J. Fox Foundation” (Grant ID: 9205).

Conflict of interest: The authors A. Oliviero and G. Foffani declare that they are cofounders of the company Neurek SL, which is a spin-off of the Foundation of the Hospital Nacional de Paraplégicos. Moreover they are inventors in the patent P201030610.

* Corresponding author. Hospital Nacional de Paraplégicos, FENNSI Group, Finca La Peraleda s/n, 45071, Toledo, Spain. Tel.: +34925247700x47509; fax +34925247745.

** Corresponding author. Neurosignals Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain

E-mail addresses: antonio@sescam.jccm.es (A. Oliviero), guglielmo.foffani@gmail.com (G. Foffani).

Experimental setup

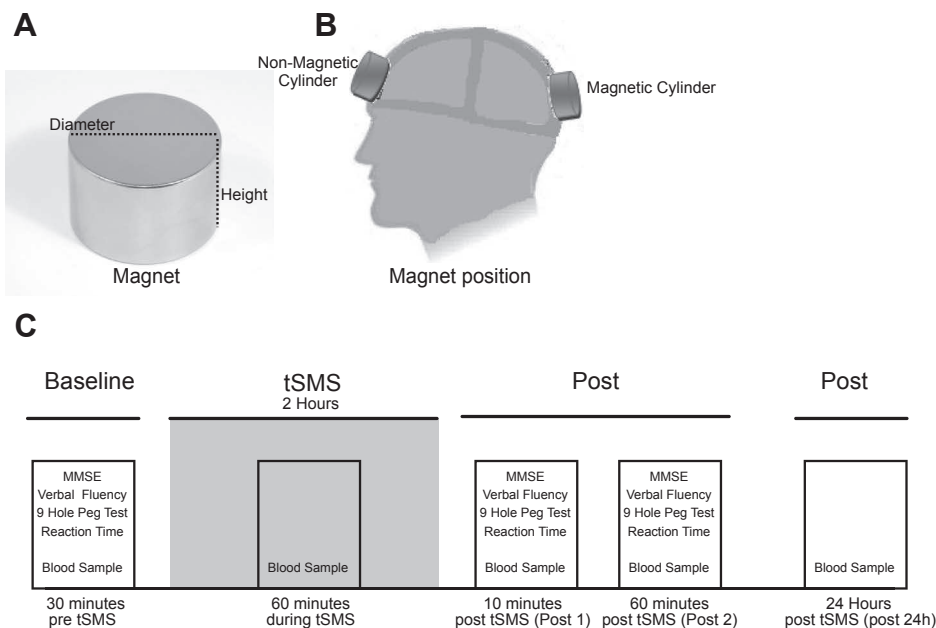


Figure 1. Schematic representation of experimental set up. A. Magnet (MAG60r, Neurek SL, Toledo, Spain). B. Magnet location over the occipital cortex (Oz location of the 10–20 EEG international system), and an additional non-magnetic cylinder over the frontal cortex (Fpz location of the 10–20 EEG international system) to counterbalance the weight of the occipital magnet. C. Time course of the experiment. The experimental protocol is divided in five time points: baseline, during tSMS, post1, post2 and 24 h.

exposure" (i.e. 8 h/day, 5 days/week) (<http://www.who.int/peh-emf/publications/facts/fs299/en/index.html>). With the magnets we normally use in our lab (MAG45r and MAG60r; Neurek SL, Toledo, Spain), at 2 cm from the axis (the approximate distance from the skull to the cortex) the magnetic field is around 150–200 mT [7], so within the safe limit proposed by the WHO. Moreover, many studies about safety of magnetic resonance imaging (MRI) techniques consider safe an exposure to magnetic fields >8T for experimental sessions that can last hours [8]. On the other hand, it cannot be excluded that the different gradient shape and/or the different magnetic field orientation may have different safety profiles.

The purpose of this study was to test the safety of prolonged tSMS (2 h) of the occipital cortex in healthy volunteers to establish safety guidelines for future tSMS experiments and therapeutic trials. We tested the effects of tSMS on a cellular level, by measuring serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and protein S-100 [9] – sensitive markers for neural or glial brain damage – in healthy volunteers before, during and after tSMS. In order to provide further evidence for the safety of tSMS, a battery of neuropsychological tests were performed to exclude cognitive adverse effects. Specifically, we chose the Mini Mental State Exam (MMSE) as an evaluation of global cognitive state [10], the Nine-Hole peg test (NHPT) to evaluate a fine motor task and visuomotor coordination, a two-choice reaction time test to assay attentional levels (and again visuomotor coordination). Verbal fluency, a cognitive process considered to be primarily frontal lobe-dependent, was tested to determine cognitive function associated to a brain location distant from the stimulated area [11].

Methods

Subjects

Seventeen healthy volunteers participated in this study (10 males; mean age 34.4 ± 7.3 years; age range 24–45 years).

Exclusion criteria were significant medical or psychiatric illness, pregnancy and concurrent use of neuroactive drugs. We also excluded individuals with pacemakers, brain stimulators, medication pumps or any type of metal object in the head including eyes – except for dental appliances or fillings – which might pose a physical hazard during tSMS. All subjects but one were right handed according to the Edinburgh handedness inventory [12]. The study was approved by the local ethical committee. Informed consent was obtained from all subjects.

Experimental set-up

Experimental set-up is shown schematically in Fig. 1.

tSMS procedures

To deliver tSMS we used a cylindrical Nickel-plated (Ni–Cu–Ni) NdFeB magnet of 60 mm diameter, 30 mm of thickness and a weight of 370 g (MAG60r, Neurek SL, Toledo, Spain). North magnetic field polarity was used (i.e. north pole was placed over the scalp). During the experiment, all subjects had tSMS over the occipital cortex (Oz location of the 10–20 EEG international system), and an additional non-magnetic cylinder was located over the frontal cortex (Fpz location of the 10–20 EEG international system) and remained fixed during the whole experiment to counterbalance the weight of the occipital cylinder. The non-magnetic cylinder was a steel nickel-coated cylinder, had the same size, a weight of 368 g similar to the MAG60r (MAG60s, Neurek SL, Toledo, Spain). The cylinders were held in place with a leather strapping system (MAGlet60+, Neurek SL, Toledo, Spain). The tSMS was applied for 2 h.

Blood samples for determining NSE and S-100

We measured serum concentrations of NSE and S100, as sensitive markers of neuronal damage and glial activation, respectively. Blood samples were taken in EDTA-free tubes from each subject at

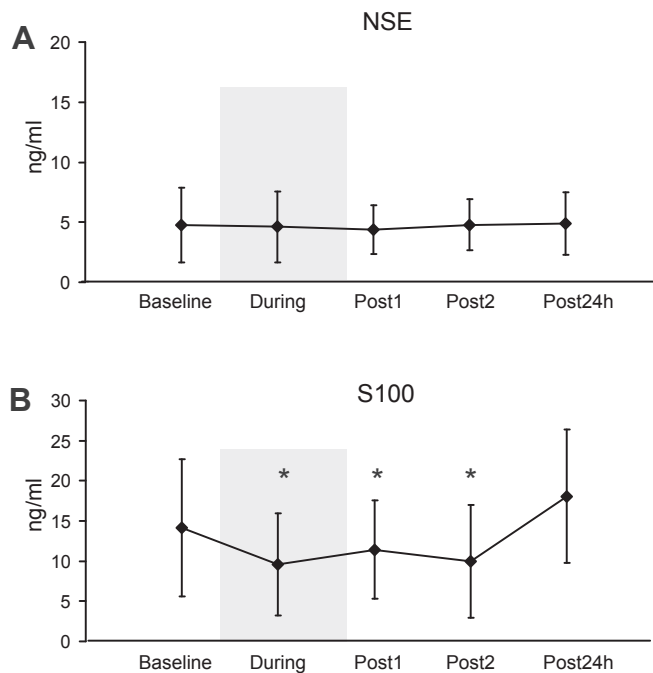


Figure 2. Time course and concentration of serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and protein S-100. A. Time course of NSE concentration (ng/ml). B. Time course of S-100 concentration (ng/ml). * = $P < 0.05$ (paired t -test). Error bars indicate standard deviations.

baseline before the tSMS treatment was started (baseline), after 60 min during the treatment (during), immediately after (post1), 60 min after (post2), and 24 h (only 13 subjects) after the end of tSMS (post 24 h). A peripheral venous catheter in the left cubital fossa (or dorsum of the forearm) was maintained throughout the experiment to allow serial blood drawing (with the exception of the 24 h blood sample that was obtained via new venipuncture). Samples were left 1 h at room temperature and 3 more hours at 4 °C to induce clot retraction. Crude sera were obtained by low-speed centrifugation (800×g), and cleared-up by medium-speed centrifugation (5000×g). Aliquots were preserved at −20 °C until used. Serum NSE measurements were performed using the Quantikine® ELISA kit for Human Enolase 2/Neuron-specific Enolase (R&D Systems). S100 quantification was performed using the Human S100B ELISA kit (Millipore). In both cases, manufacturers' instructions were followed.

In one subject, it was not possible to obtain blood samples during tSMS and in post1. In another subject, it was not possible to obtain blood samples in post1. Two samples during tSMS were excluded from the S100 analyses as outliers. Two additional samples in post2 were excluded from the NSE analyses because of a visually evident hemolysis (these samples were included in the S100 analyses). Thus, the final serum sample size (n) was: baseline $n = 17$, during $n = 16$ ($n = 14$ for S100), post1: $n = 15$, post2: $n = 15$ ($n = 17$ for S100), 24 h: $n = 13$.

Assessment of cognitive and motor performance

To detect possible side effects, the following investigations were performed before and after the tSMS testing on the same day. The neuropsychological test battery consisted of the Folstein Mini-Mental Status Examination (MMSE) [10], and a phonemic Verbal Fluency Test [11] during which the letters F, A and S were presented with subjects required to say as many words beginning with the letter as possible during a 60 s period. Order of letter presentation

was counterbalanced across subjects and conditions – pre- and post-testing. Letter fluency scores were based on the number of correct items generated across the three letter conditions. The Nine-Hole peg test (NHPT) was performed to test fine motor skills (manipulative dexterity) and complex visuomotor coordination with the right hand (this test was not performed with the left hand due to the presence of venous catheter). A two-choice Reaction Time (RT) test measured visuomotor speed. The subject was instructed to press the corresponding key to an arrow direction (pointing left or right) appearing on a screen as quickly and accurately as possible. The test consisted of three blocks, each with 120 trials. RTs and error rates were recorded, with the latter determined as a measure of accuracy to look for a possible trade-off between speed and accuracy.

Statistical analyses

Blood measures (NSE and S100) were compared to baseline with paired t -tests. Note that we purposely did not correct for multiple comparisons in order to conservatively maximize the possibility to find significant changes ($P < 0.05$). One-way ANOVA was employed to corroborate any unexpected significant findings. Cognitive measures were assessed with paired t -tests, except for data from the two-choice reaction time task, which were analyzed with a two-way repeated-measures ANOVA (with factors hand and time) to fully exploit the statistical power given by two hands. Values are given as mean ± standard deviation.

Results

The 2-h tSMS session was well tolerated by all 17 subjects. None of the subjects needed to interrupt or terminate the session due to side effects. One subject reported mild headache and numbness at the end of the tSMS, but was able to complete the study.

Blood tests

NSE concentrations were not affected by tSMS (Fig. 2A), neither during the stimulation (paired t -test, $P = 0.74$, $n = 16$), immediately after (post1, $P = 0.58$, $n = 15$), 1 h after (post2, $P = 0.98$, $n = 15$), nor 24 h after ($P = 0.92$, $n = 13$). The average NSE concentration in post2, which represents the most relevant time point from a safety perspective, was 4.79 ± 2.14 ng/ml (baseline: 4.75 ± 3.12 ng/ml).

S100 concentrations did not increase with tSMS (Fig. 2B). Interestingly, S100 concentrations were actually significantly decreased both during tSMS ($P = 0.0014$, $n = 14$), immediately after tSMS (post1, $P = 0.0166$, $n = 15$) and 1 h after (post2, $P = 0.0083$, $n = 17$), but not 24 h after ($P = 0.33$, $n = 13$). The average S100 concentration in post2 was 9.98 ± 7.05 ng/ml (baseline: 14.11 ± 8.54 ng/ml). These decrease in S100 concentrations remained significant when the data were analyzed with a more conservative one-way ANOVA, either using repeated-measures design with only the 11 subjects for which all time points are available ($F(4,40) = 5.7$, $P = 0.0009$), or an independent-measures design with all subjects and all available time points ($F(4,71) = 3.2$, $P = 0.0178$).

Cognitive tests

In the two-choice reaction time task, RTs were faster with the right hand, as expected (two-way ANOVA, hand: $F(1,16) = 24.0$, $P = 0.0002$), but tSMS did not induce any significant effect (time: $F(2,32) = 1.5$, $P = 0.24$; interaction: $F(2,32) = 1.5$, $P = 0.24$; Fig. 3A). The number of errors made by the subjects during the task was slightly higher with the right hand (hand: $F(1,16) = 4.8$, $P = 0.0440$) and again was not affected by tSMS (time: $F(2,32) = 1.3$, $P = 0.29$; interaction: $F(2,32) = 0.9$, $P = 0.41$; Fig. 3B).

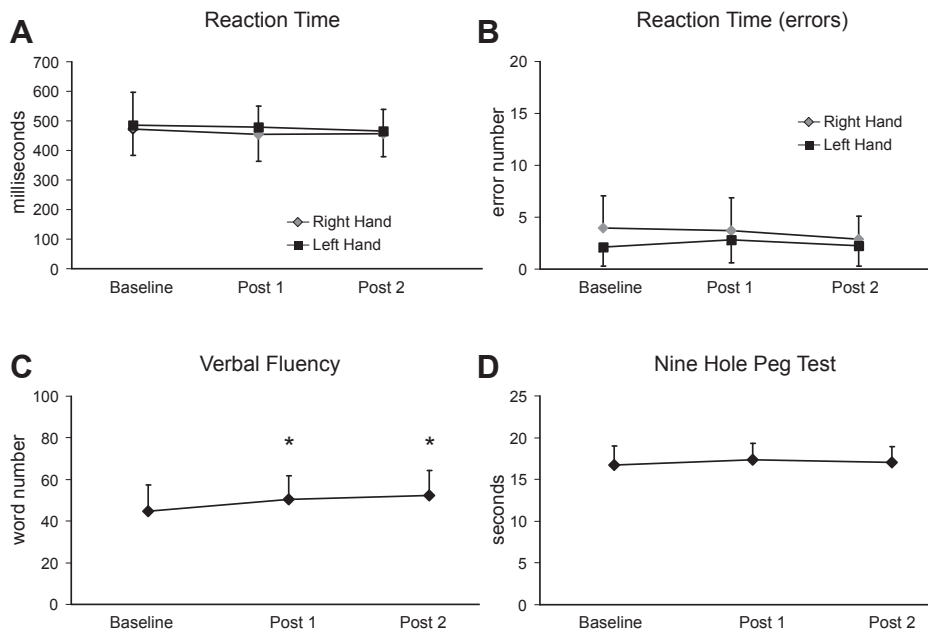


Figure 3. Time course of the cognitive assessment and motor performance. A. Time course of the Reaction Time (in milliseconds). B. Time course of the number of errors. C. Verbal Fluency Test. Time course of the total words counting. D. Time course of the Nine Hole Peg Test. * = $P < 0.05$ (paired t -test). Error bars indicate standard deviations.

Word fluency was not impaired by tSMS (Fig. 3C). There was actually an improvement at post1 (paired t -test, $P = 0.0091$) and at post2 ($P = 0.0026$), which was confirmed by a more conservative one-way ANOVA ($F(2,32) = 7.9$, $P = 0.0016$), probably reflecting a slight learning effect.

The time to perform the NHPT was not affected by tSMS ($P > 0.22$; Fig. 3D). MMSE did not change after tSMS (baseline = 29.3 ± 1.1 ; post1 = 29.6 ± 0.6 ; post2 = 29.6 ± 0.8 ; $P > 0.33$, data not shown in figures).

Discussion

The principal finding of this study was that 2 h of tSMS over the occipital cortex appears to be a safe procedure.

There is currently no gold standard for assessing safety for NIBS protocols. At least three types of safety studies can be found in the NIBS literature: (i) studies that evaluate safety a posteriori (similarly to phase 4 clinical trials), assessing the incidence of possible adverse effects in large cohort of patients/subjects that already received specific NIBS protocols (e.g. Refs. [13–15]); (ii) studies that evaluate safety of a known NIBS protocol for its application to a new indication (similarly to phase 1 repositioning clinical trials), assessing the incidence of possible adverse effects in a small cohort of patients (e.g. Refs. [16,17]); (iii) studies assessing safety of a recently-introduced NIBS technique in healthy subjects (e.g. Ref. [18]). Our study belongs to the third group.

The serum level of NSE is a marker of neuronal damage that has been previously used to assess NIBS safety [18–20]. No NSE changes have been reported with cathodal tDCS in 5 normal subjects [19], rTMS in 14 depressed patients [20] and tACS in 8 normal subjects [18]. We also found no changes in NSE levels either during or after tSMS in our experiments. Even though negative results always need to be considered with caution, our study was conservatively designed to achieve higher statistical power compared to previous NIBS safety studies ($n = 15$ for NSE at the most relevant time point, i.e. post2), in order to minimize the risk of type II error.

We also measured serum levels of S100, a marker of glial damage. Only one of the above NIBS safety studies assessed S100 levels,

finding no changes [20]. Our *a priori* hypothesis was that if S100 increased it would have suggested a glial damage and a safety hazard [21]. Surprisingly, we found that the S100 concentration decreased during and after the tSMS. This unexpected result might intriguingly suggest reduced glial reactivity, which could reflect a certain level of tissue protection [21]. However, it needs to be stressed that this is not a definitive finding, and should be confirmed in sham-controlled experiments in order to exclude non-specific effects [22], which is beyond the scope of the present work. Even though we do not intend to make any strong claims about this unexpected S100 decrease, it does convincingly show that S100 does not increase, strongly supporting the safety of our tSMS protocol.

We observed no significant impairment in performance of visuomotor or cognitive tests. These tests are not typically included in previous NIBS safety studies, but are particularly important in our protocol given the significant behavioral effects recently reported with the application of tSMS to the visual cortex in monkeys [23]. It is important to note that we intended to exclude gross behavioral changes that would be hazardous for the everyday living. Indeed, because tSMS reduces cortical excitability, tSMS is expected to induce subtler behavioral effects associated with the execution of more complex visuomotor/cognitive tasks.

In the present study, we did not perform EEG recordings, which were instead used in previous NIBS safety studies (e.g. Ref. [18]). The rationale for using EEG recordings to assess NIBS safety is because of the increased risk of seizures with protocols that increase cortical excitability. tSMS was shown to reduce cortical excitability both in the sensorimotor cortex of humans [2,3,24], and in the visual cortex of cats and monkeys [23]. Decreased cortical excitability should reduce rather than increase the risk of seizures. In fact, it has been demonstrated that tSMS reduces epileptic activity in animal models [25,26]. We therefore argue that EEG recordings are not necessary to establish tSMS safety.

Overall, the purpose of this study was to establish if tSMS could be delivered safely in humans in order to provide safe stimulation patterns for future experimental and therapeutic trials. We confirmed the safety of static magnet fields within the

recommended limits reported by the WHO (<http://www.who.int/peh-emf/publications/facts/fs299/en/index.html>). However, it cannot be excluded that stimulation parameters different from ours (different gradient shape, magnetic field orientation, duration, etc.) might have different safety profiles.

Acknowledgments

The authors thank A.M. Escobar-Corroto and M. Peñas de la Iglesia for valuable technical support.

References

- [1] Schulz R, Gerloff C, Hummel FC. Non-invasive brain stimulation in neurological diseases. *Neuropharmacology* 2013;64:579–87.
- [2] Oliviero A, Mordillo-Mateos L, Arias P, Panyavin I, Foffani G, Aguilar J. Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol* 2011;589:4949–58.
- [3] Silbert BI, Pevic DD, Patterson HI, Windnagel KA, Thickbroom GW. Inverse correlation between resting motor threshold and corticomotor excitability after static magnetic stimulation of human motor cortex. *Brain Stimul* 2013;6:817–20.
- [4] Rosen A. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys* 2003;39:163–73.
- [5] Coots A, Shi R, Rosen A. Effects of a 0.5-T static magnetic field on conduction in guinea pig spinal cord. *J Neurol Sci* 2004;222:55–7.
- [6] Rosen AD, Lubowsky J. Magnetic field influence on central nervous system function. *Exp Neurol* 1987;95:679–87.
- [7] Rivadulla C, Foffani G, Oliviero A. Magnetic field strength and reproducibility of Neodymium magnets useful for transcranial static magnetic field stimulation of the human cortex. *Neuromodulation* 2014;17:438–41.
- [8] MHRA. Safety guidelines for magnetic resonance imaging equipment in clinical use. 2014 <http://www.mhra.gov.uk/Publications/Safetyguidance/DeviceBulletins/CON2033018>.
- [9] Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human nervous system. *Stroke* 1987;18:911–8.
- [10] Folstein M, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-Mental State” a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189–98.
- [11] Tranel D, Bigler ED, Howieson DB, Lezak MD. *Neuropsychological assessment*. Oxford University Press; 2012, ISBN 9780195395525.
- [12] Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 1971;9:97–113.
- [13] Machii K, Cohen D, Ramos-Estebanez C, Pascual-Leone A. Safety of rTMS to non-motor cortical areas in healthy participants and patients. *Clin Neurophysiol* 2006;117:455–71.
- [14] Poreisz C, Boros K, Antal A, Paulus W. Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Res Bull* 2007;72:208–14.
- [15] Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:1133–45.
- [16] Chae JH, Nahas Z, Wassermann E, Sallee FR, George MS. A pilot safety study of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in Tourette's syndrome. *Cogn Behav Neurol* 2004;17:109–17.
- [17] Carey JR, Evans CD, Anderson DC, Pascual-Leone A. Safety of 6-Hz primed low-frequency rTMS in stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 2008;22:185–92.
- [18] Chaieb L, Antal A, Pisoni A, Focke N, Paulus W. Safety of 5 kHz tACS. *Brain Stimul* 2014;7:92–6.
- [19] Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 2003;114:600–4.
- [20] Ullrich H, Kranaster L, Sigges E, Andrich J, Sartorius A. Neuron specific enolase and serum remain unaffected by ultra high frequency left prefrontal transcranial magnetic stimulation in patients with depression: a preliminary study. *J Neural Transm* 2013;120:1733–6.
- [21] Donato R, Cannon BR, Sorci G, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013;13:24–57.
- [22] Nogueira MI, Abbas SY, Campos LG, Allemandi W, Lawson P, Takada SH, et al. S100beta protein expression: gender- and age-related daily changes. *Neurochem Res* 2009;34:1355–62.
- [23] Aguila J, Cudeiro J, Rivadulla C. Effects of static magnetic fields on the visual cortex: reversible visual deficits and reduction of neuronal activity. *Cereb Cortex* 2014 [Epub ahead of print].
- [24] Kirimoto H, Tamaki H, Matsumoto T, Onishi H. Effect of transcranial static magnetic field stimulation over the sensorimotor cortex on somatosensory evoked potentials in humans. *Brain Stimul* 2014 Nov-Dec;7(6):836–40.
- [25] McLean MJ, Engström S, Holcomb RR, Sanchez D. A static magnetic field modulates severity of audiogenic seizures and anticonvulsant effects of phenytoin in DBA/2 mice. *Epilepsy Res* 2003;55:105–16.
- [26] McLean MJ, Engström S, Qinkun Z, Spankovich C, Polley DB. Effects of a static magnetic field on audiogenic seizures in black Swiss mice. *Epilepsy Res* 2008;80:119–31.

Static Magnetic Field Stimulation over the Visual Cortex Increases Alpha Oscillations and Slows Visual Search in Humans

Javier J. Gonzalez-Rosa,¹ Vanesa Soto-Leon,² Pablo Real,¹ Carmen Carrasco-Lopez,² Guglielmo Foffani,^{3,4} Bryan A. Strange,^{1,5} and Antonio Oliviero²

¹Laboratory for Clinical Neuroscience, Centre of Biomedical Technology, Technical University of Madrid, 28223 Madrid, Spain, ²FENNSI Group, and

³Neural Bioengineering Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, 45071 Toledo, Spain, ⁴Centro Integral de Neurociencias A.C., HM Puerta del Sur, Hospitales de Madrid, Móstoles and Medical School, CEU-San Pablo University, 28938 Madrid, Spain, and ⁵Department of Neuroimaging, Reina Sofia Centre for Alzheimer's Research, 28031 Madrid, Spain

Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) was recently introduced as a promising tool to modulate human cerebral excitability in a noninvasive and portable way. However, a demonstration that static magnetic fields can influence human brain activity and behavior is currently lacking, despite evidence that static magnetic fields interfere with neuronal function in animals. Here we show that transcranial application of a static magnetic field (120–200 mT at 2–3 cm from the magnet surface) over the human occiput produces a focal increase in the power of alpha oscillations in underlying cortex. Critically, this neurophysiological effect of tSMS is paralleled by slowed performance in a visual search task, selectively for the most difficult target detection trials. The typical relationship between prestimulus alpha power over posterior cortical areas and reaction time (RT) to targets during tSMS is altered such that tSMS-dependent increases in alpha power are associated with longer RTs for difficult, but not easy, target detection trials. Our results directly demonstrate that a powerful magnet placed on the scalp modulates normal brain activity and induces behavioral changes in humans.

Key words: EEG; NIBS; occipital cortex; static magnetic field; TMS; visual search

Introduction

Magnets have been used in attempts to treat disorders of the nervous system since Aetius of Amida (Häfeli, 2007). However, modern neuroscience has seen limited exploration of the effects of static magnetic fields on human brain function (Roberts et al., 2011), despite evidence that static magnetic fields interfere with neural function in animals (Rosen and Lubowsky, 1987, 1990; McLean et al., 2003, 2008; Yang et al., 2011; Wu and Dickman, 2012; Aguila et al., 2014). We recently demonstrated that applying transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) in humans reduces the excitability of the motor cortex, as measured by a reduced amplitude of motor-evoked potentials elicited by transcranial magnetic stimulation (TMS; Oliviero et al., 2011)—a result that has

been subsequently replicated (Silbert et al., 2013). However, direct measurements of the impact of tSMS on human brain activity and behavior are presently lacking.

Considering that tSMS alters normal functioning of membrane ion channels (Wieraszko, 2000; Rosen, 2003, 2010; Yang et al., 2011) and that the latter are critical for neuronal oscillations (Wang, 2010), we hypothesized that tSMS is able to modulate electroencephalogram (EEG) activity. We were specifically interested in the EEG oscillations in the alpha frequency range (7–14 Hz), which is usually most pronounced bilaterally in posterior regions of the head and suppressed by eye opening (Niedermeyer, 1993; Barry et al., 2007). Alpha-band EEG activity has been shown to represent the state of visual cortex excitability (Pfurtscheller, 2001, 2003), as measured by phosphorescence induced by TMS, with stronger alpha power corresponding to reduced cortical excitability (Romei et al., 2008a,b). We thus hypothesized that a reduction of cortical excitability induced by tSMS of the visual cortex would be expressed as an increase of alpha power.

We investigated the electrophysiological and behavioral effects of tSMS over the occipital cortex. We specifically tested whether a tSMS-dependent decrease in cortical excitability is reflected in a modulation of posterior alpha oscillations (Fig. 1A). Posterior alpha oscillations play an important role in visual perception (VanRullen and Macdonald, 2012) and selective visual attention (Foxe et al., 1998). In particular, ongoing alpha oscillations influence successful detection of a predefined target in vi-

Received Oct. 12, 2014; revised May 3, 2015; accepted May 8, 2015.

Author contributions: J.J.G.-R., G.F., B.A.S., and A.O. designed research; J.J.G.-R., V.S.-L., P.R., and C.C.-L. performed research; J.J.G.-R., V.S.-L., G.F., and A.O. analyzed data; J.J.G.-R., G.F., B.A.S., and A.O. wrote the paper.

This research was funded by the "Ministerio de Economía y Competitividad" of Spain and the "Fondo Europeo de Desarrollo Regional—FEDER" (project SAF2012-39589). J.J.G.-R. is supported by a Marie Curie fellowship (FP7-COFUND program). B.A.S. is supported by a Marie Curie Career Integration Grant (FP7-PEOPLE-2011-CIG 304248) and Grant SAF2011-27766 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

G.F. and A.O. declare that they are cofounders of the company Neurek SL, which is a spinoff of the Foundation of the Hospital Nacional de Paraplégicos. Moreover, they are inventors listed on the following patents: P201030610 and PCT/ES2011/070290 (patent abandoned). The authors declare no other competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Antonio Oliviero, Hospital Nacional de Paraplégicos, FENNSI Group, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain. E-mail: antonio@secam.jccm.es or antonio.oliviero@hotmail.com.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4232-14.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/359182-12\$15.00/0

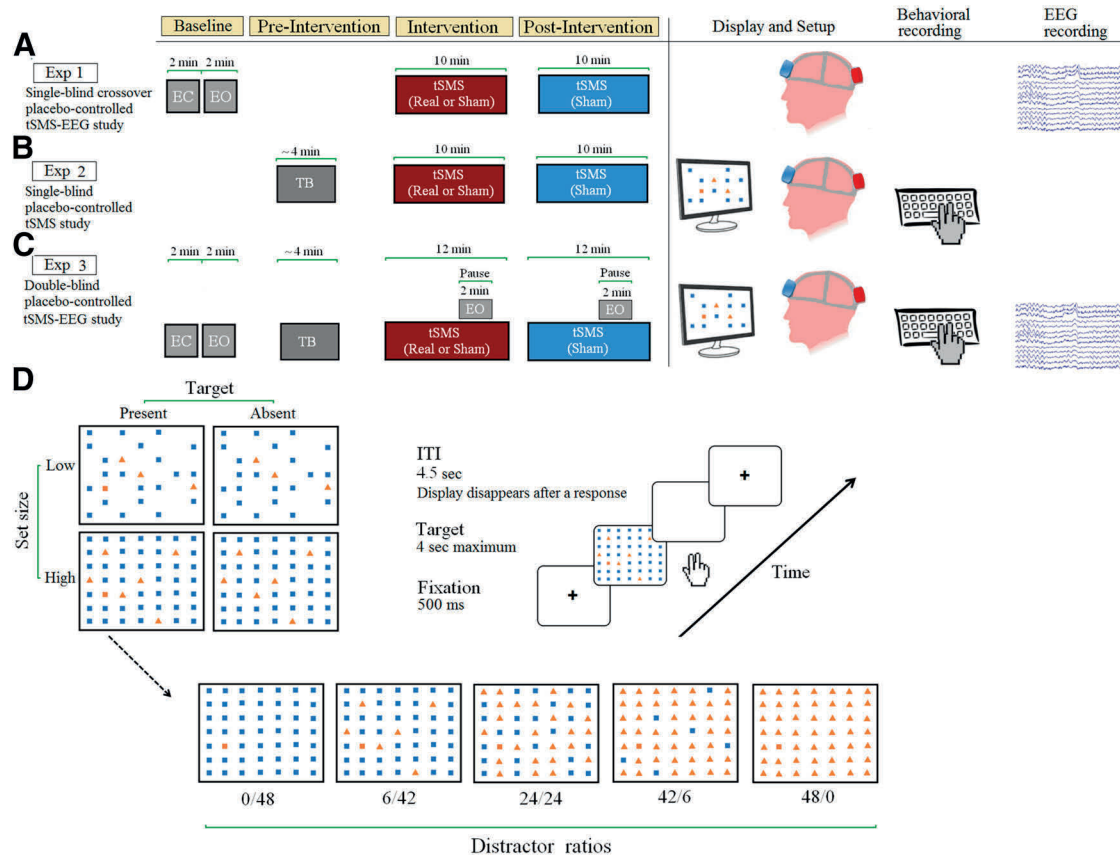


Figure 1. Experimental protocols. **A–C**, Time line (left) and experimental setup (right) for Experiments 1–3. **A**, In Experiment 1, resting EEG alpha activity was measured throughout the experiment. **B**, In Experiment 2, only behavioral data were collected during the performance of the conjunction visual search task. **C**, In Experiment 3, EEG alpha activity was measured during task performance, in addition to resting EEG measures during baseline and during 2 min “pause” time windows during intervention and postintervention sessions. EC, Eyes closed; EO, eyes open; TB, task baseline. Red cylinder shows the scalp position over which the magnetic NdFeB cylinder (real-tSMS) or the nonmagnetic steel cylinder (sham-tSMS) was located over the visual cortex. Blue cylinder shows the scalp position over which a nonmagnetic steel cylinder was always located over the frontal cortex (around Fpz location) as a counterweight to the occipital cylinder. **D**, Top left, Example of a representative distractor ratio in stimulus array and all possible conditions for each distractor ratio (set size, and target presence/absence). Top right, Schematic of time course of an example trial (high set size, 6:42 distractor ratio, and target present). Bottom, Example of target-present trials in the 0:48, 6:42, 48:0, 24:24, and 42:6 distractor ratio conditions. ITI, Intertrial interval; Exp, experiment.

sual selective attention tasks (Dugué et al., 2011; Foxe and Snyder, 2011), with higher prestimulus alpha power associated with less likely, or slower, visual target detection (Thut et al., 2006; Hanslmayr et al., 2007). Thus, we also tested whether tSMS of the visual cortex modulates visual search performance in a conjunction search task with a distractor-ratio manipulation (Fig. 1B,D; Wolfe et al., 1989; Poisson and Wilkinson, 1992). Finally, we repeated the visual search task while simultaneously recording EEG (Fig. 1C) to examine the relationship between tSMS-dependent behavioral changes and tSMS-dependent increase in prestimulus alpha power.

Materials and Methods

A total of 76 right-handed subjects (39 women) with normal or corrected-to-normal visual acuity, no history of neurological or psychiatric disorders, and without any exclusion criteria for tSMS and TMS participated in our study. In Experiment 1, participants completed a single-blind, crossover, placebo-controlled tSMS-EEG study. In Experiment 2, participants were randomized to two equal-sized groups (real and sham, single-blind placebo-controlled tSMS study). In Experiment 3, a new group of participants completed a double-blind placebo-controlled tSMS-EEG study. In Experiment 2 and Experiment 3, a between-subjects design was used to avoid potential learning effects across repeated sessions. There are no differences across groups regarding sex, age, or educational level. Participants were recruited by adver-

tisement and gave written informed consent to participate in the study, which was approved by the local ethics committee of the “Hospital Nacional de Paraplégicos” of Toledo (Spain).

Transcranial static magnetic stimulation

The magnet used for tSMS in all experiments was a cylindrical nickel-plated (Ni-Cu-Ni) NdFeB magnet of 60 mm diameter, 30 mm thickness, and a weight of 670 g (model Mag60r; custom-made by Supermagnete for Neurek SL). The nominal strength of this magnet is 120 kg, with an intensity of the magnetic field at the surface of the magnet, on the cylinder axis, of 0.45 T (Rivadulla et al., 2014). At 2–3 cm from the magnet surface (i.e., the approximate depth of the visual cortex from the scalp) the magnetic field strength of this magnet on the cylinder axis is 120–200 mT (Rivadulla et al., 2014). Because our previous work (Oliviero et al., 2011) showed that tSMS-dependent reduction of cortical excitability did not depend on polarity, the magnetic field polarity was set randomly north or south unless otherwise specified. A nonmagnetic metal cylinder, of the same size, weight, and appearance as the real magnet (Mag60s, Neurek SL), was used for sham stimulation. An additional nonmagnetic metal cylinder was always placed on the frontal cortex as a counterweight. We recently showed that tSMS is a safe procedure in humans (Oliviero et al., 2014).

Experiment 1

Subjects and procedure. The experimental procedure is depicted in Figure 1A (Experiment 1). Sixteen participants (6 women; age range, 24–45

years; mean age, 32.9 years; SD = 6.3) completed a single-blind, cross-over, placebo-controlled tSMS-EEG study. Each subject underwent both sham and real stimulation on separate days (order counterbalanced across subjects), but at least 1 week apart, at the same hour of the day. Participants were seated comfortably in a dimly lit, sound-attenuated, and electrically shielded room. A video camera was used to record the experiment and monitor the eye movements of the participants, who were asked to relax quietly while the spontaneous EEG activity at rest was recorded for the different experimental conditions: (1) during 4 min baseline (2 min eyes closed and 2 min eyes open; “baseline”); (2) during a tSMS (real or sham) session for 10 min (“intervention”); and (3) for 10 additional minutes after removing the magnet (“postintervention”). A nonmagnetic metal cylinder was placed over the visual cortex at the beginning of the baseline and was replaced by the real magnet or the sham magnet (i.e., another nonmagnetic metal cylinder) for the intervention, and the original nonmagnetic metal cylinder was placed again at the end of the intervention. The EEG session lasted 24 min in total.

Data acquisition. Simultaneous EEG activity was recorded using a 21-channel EEG cap with built-in Ag/AgCl electrodes (Electro-Cap International, Inc.). Electrode positions were located according to the 10/20 EEG International System (Fp1, Fpz, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, T3, C3, Cz, C4, T4, T5, P3, Pz, T4, T6, POz, O1, and O2), plus two electrocardiogram (ECG) electrodes (one ECG electrode was placed on the sternum and the other over the precordium). Impedance was kept below 8 k Ω . EEG signals were recorded using a montage with earlobe electrodes serving as references, and by digital EEG equipment (SAM 32, MicroMed; band-pass filter, 0.1–128 Hz; sampling frequency, 256 Hz).

Data analysis. Data analysis was performed using MATLAB (MathWorks) and EEGLAB (<http://scn.ucsd.edu/eeGLAB>). EEG signals were visually inspected for artifacts, and epochs containing large artifacts such as large blinks or gross motor movements were discarded from further analysis. To remove smaller eye-blink artifacts, an independent component analysis procedure was used (Makeig et al., 1996). Power spectral density was estimated using Welch's averaged modified periodogram method (linear detrending, no overlapping, Hamming windowing, 0.5 Hz frequency resolution). For each condition, single-segment power spectra were computed via FFT and then averaged to yield the mean power spectrum. Individual alpha frequency (IAF) was estimated from the mean spectrum over posterior scalp sites by means of peak detection between 7 and 14 Hz. The mean spectral amplitude within the frequency range of the IAF ± 2 Hz (Klimesch, 1999) was calculated and log transformed. Spectral estimates of relative alpha power during intervention and postintervention at an electrode i were then obtained for each subject by subtracting the log-transformed alpha power during open-eyes baseline ($\text{Pow}_{i,\text{baseline}}$) from the log-transformed alpha power during intervention ($\text{Pow}_{i,\text{intervention}}$), or postintervention, according to the following formula:

$$\text{Relative Alpha Power}(i) = \text{Log}(\text{Pow}_{i,\text{intervention}}) - \text{Log}(\text{Pow}_{i,\text{baseline}}).$$

Therefore, increases in power from baseline during and after the intervention are expressed as positive values. The resulting relative alpha power was collapsed across successive 150 s time bins for analysis purposes [yielding four arbitrary time bins during intervention (T1, T2, T3, T4) and postintervention (T5, T6, T7, T8)].

Experimental debrief revealed that participants were not able to recognize whether the metallic cylinder used during intervention was the real magnet or sham (46.9% of correct guesses; Pearson χ^2 test, $p = 0.71$).

Experiment 2

Subjects and procedure. Thirty participants (17 women; age range, 23–42 years; mean age, 29.3 years; SD, 4.7) were randomized to two equal-sized groups (real and sham single-blind, placebo-controlled tSMS study; Fig. 1B). Each subject, therefore, underwent either sham ($n = 15$) or real ($n = 15$) stimulation. One participant was excluded from the analyses due to technical problems during the data acquisition. To keep the distance from magnet to scalp equivalent to that in Experiment 1, participants in Experiment 2 wore the same EEG electrode cap during behavioral testing (without any EEG recordings) as in Experiment 1.

Conjunction visual search task. Three different stimuli were used to create the visual search displays: a light blue square, an orange triangle, and an orange square (Fig. 1D). Stimuli of different colors were matched in luminance and presented on a white background. The target was always an orange square (i.e., a specific combination of color and shape). Therefore, the orange triangle served as a same-color distractor while the light blue square served as a same-shape distractor. At a viewing distance of 60 cm, each individual stimulus subtended a visual angle of 0.57° (20×13 pixels) horizontally and vertically. All stimuli were presented in a $17.52^\circ \times 12.36^\circ$ field (621×271 pixels), and the minimum distance between the centers of neighboring items was 2.86° horizontally and 2° vertically.

In visual search tasks, an observer searches for a predefined target in an array containing distractor objects, and the primary dependent variable is the function relating reaction time (RT) to the number of items in the display (“set size”; Wolfe et al., 1989) or to the relative frequency of the two types or subsets of distractors (“distractor ratio effect”; Wolfe et al., 1989; Treisman and Sato, 1990; Poisson and Wilkinson, 1992; Shen et al., 2003). Thus, the experiment was a distractor ratio and set size by “target presence” factorial design. That is, the first factor was the number of objects (set size) according to the fixed total number of stimuli that were presented in the display. In all of the conditions, the total number of stimuli was always fixed at 24 (“low set size”) or 48 (“high set size”). The second factor was the presence or absence of target according to whether the target appeared in the display or not. For each trial, the relative frequency of the two types of distractors (same-shape/same-color) was manipulated across the following five possible distractor ratios: 0:24, 3:21, 12:12, 21:3, and 24:0 for trials with low set size, and 0:48, 6:42, 24:24, 42:6, and 48:0 for trials with high set size. For simplicity, in the text we only use high set size values when we refer to set distractor. The display was divided into a 7×7 imaginary grid box of 49 invisible regions. For target-present trials, once the display was generated, one of the distractors was randomly chosen to be replaced by the target stimulus (orange square). Therefore, in each display the total maximum number of distractors was 48 (49 for target-absent trials). Low- and high-set size conditions occurred with equal probability (50%), whereas target-present or target-absent conditions occurred with a 3:1 probability (75% and 25%, respectively). For target-present trials, the target could appear at any location among all possible arrays of items. The specific combination was assigned at random to each participant, and trial-type order and position of items within stimulus arrays was pseudorandomized with the constraint that all possible combinations of set size, distractor ratio, and target presence had to occur every 40 trials (~ 4 min). This means that for every intervention session we had three consecutive blocks of ~ 3 – 4 min each for a total of ~ 10 min of recording.

The task began with a ~ 4 min preintervention session, followed by a 10 min intervention session (tSMS or sham), and then by a 10 min postintervention session. Each trial started with a black fixation cross presented centrally for 500 ms, followed by the search display, which remained on screen until the subject responded or until a maximum of 4 s had elapsed. The maximum duration of each trial was therefore 4.5 s, and there were a total of 120 trials during each session (intervention and postintervention). Participants were instructed to maintain central eye fixation when the fixation cross stayed on the screen, at the beginning of each new trial. After a response was given, the stimulus display was replaced by a blank screen until the next trial. To reduce the possibility of a speed–accuracy trade-off, participants were asked to locate as quickly as possible the target stimulus via forced choice (i.e., they pressed one of two keys to indicate target presence or absence, respectively). Behavioral performance was assessed by reaction time and the number of errors. The experiment lasted 24 min in total.

A postexperimental debriefing confirmed that participants were not able to detect whether the metallic cylinder used during the intervention was the real magnet or the sham (58.6% of correct guesses; Pearson χ^2 test, $p = 0.36$).

Experiment 3

Subjects and procedure. Thirty participants (16 women; age range, 18–31 years; mean age, 24.1 years; SD, 3.1) completed a double-blind, placebo-

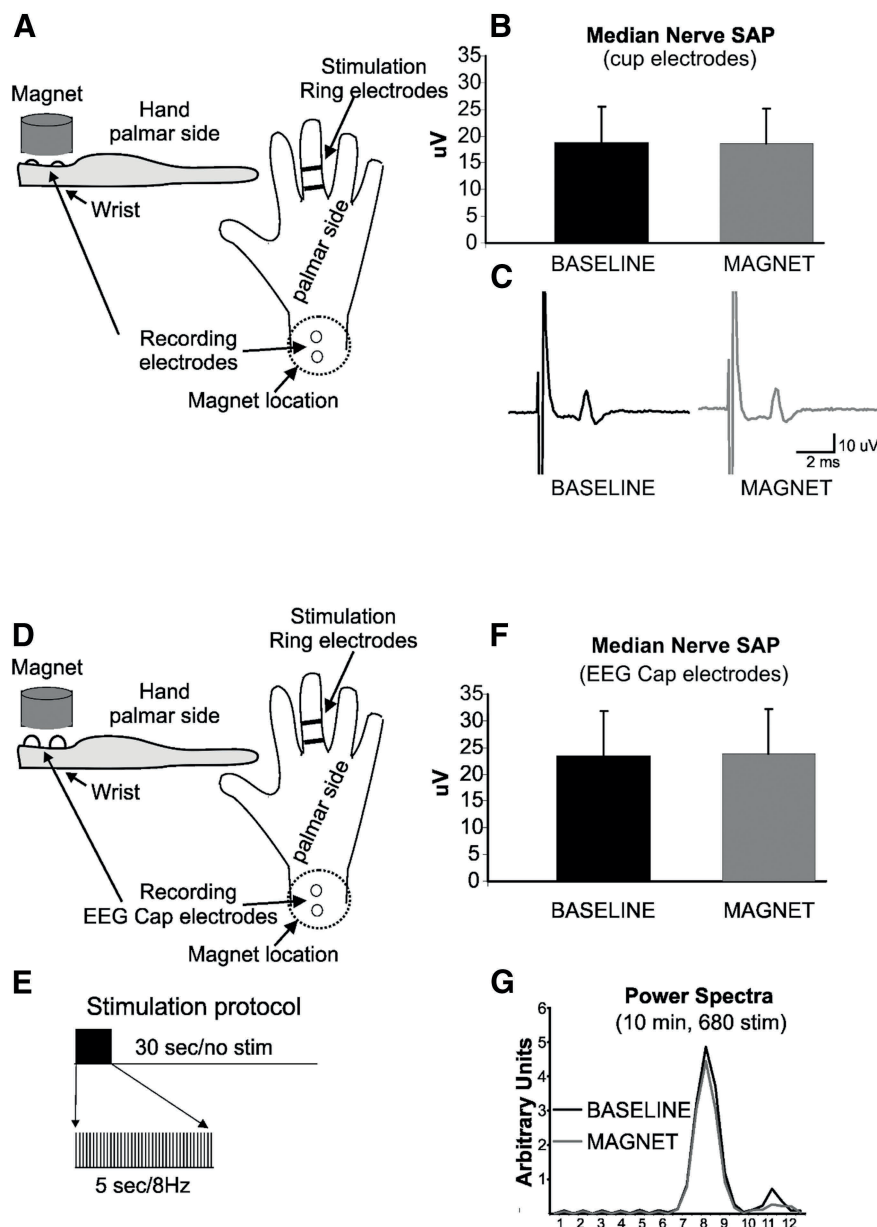


Figure 2. Control experiments. **A**, Schematic representation of the experimental setup of Experiment 4.1. **B**, SAP amplitudes, using standard cup electrodes, were identical during baseline and SMS. **C**, SAPs from a representative subject. **D**, Schematic representation of the experimental setup of Experiment 4.2. **E**, The stimulation protocol was a train of 40 stimuli at 8 Hz (5 s) followed by 30 s of rest. This protocol was repeated 17 times in each condition (baseline and SMS). **F**, SAP amplitudes, using EEG cap electrodes, were identical in baseline and during SMS. **G**, Power spectra showing the artificially induced 8 Hz SAP oscillations; these were identical during baseline and SMS.

controlled EEG-tSMS study (Fig. 1C). Each subject underwent either sham ($n = 15$) or real ($n = 15$) stimulation. Experiment 3 was designed to replicate and integrate the results of Experiments 1 and 2 by simultaneous recording of brain EEG activity and behavioral performance during tSMS stimulation. The behavioral setup of Experiment 2 was thus replicated by using the same task paradigm, adding simultaneous EEG recordings.

The most critical modification with regard to Experiments 1 and 2 was, as stated above, that the protocol was double blind instead of single blind. Additionally, the magnetic field polarity during tSMS was held constant (always south pointing toward the visual cortex), and an opaque plastic film was also interposed between the magnet (real or sham) and the EEG cap to avoid any contact between the gel and the metal cylinder. To obtain a measure of resting EEG alpha power during the intervention, a 2

min pause period was inserted after two-thirds of the task had been completed (for intervention and postintervention periods). This resulted in participants receiving a tSMS (real or sham) session for ~ 12 min. Because tSMS was shown to reduce motor cortex excitability both with 10 min durations (Oliviero et al., 2011) and 15 min durations (Silbert et al., 2013), we considered the difference between 10 min (Experiments 1 and 2) and 12 min (Experiment 3) negligible for the final results of the present study. In addition to recording 4 min baseline EEG activity (2 min with eyes closed and 2 min with eyes open) and before tSMS (as done in Experiment 1), EEG activity was also recorded during ~ 4 min of preintervention task performance. Thus, Experiment 3 lasted 32 min in total.

Data analysis. EEG data analysis was performed as in Experiment 1, but for each subject alpha power was normalized to the preintervention period for task periods and to the eyes-open baseline for pause periods. Furthermore, single-trial prestimulus oscillatory activity in the alpha band was also assessed to investigate the relationship between tSMS-dependent changes in alpha activity and tSMS-dependent changes in behavioral performance. Based on previous studies (Foxe et al., 1998; Thut et al., 2006; Hanslmayr et al., 2007), we focused on the time window of 1000–500 ms before target onset, during which alpha band power changes have been shown to predict visual perception performance (Hanslmayr et al., 2007; van Dijk et al., 2008; Foxe and Snyder, 2011). Consistent with previous evidence showing strong connections between ongoing alpha oscillations and the generation of event-related brain potentials (Basar, 1980; Klimesch et al., 2007b; Min et al., 2007), we did not analyze the last interval of pretarget activity (500 ms before target stimulus onset) to avoid any influence of fixation cross presentation on alpha activity, which could add variability to the data. Single-trial prestimulus alpha power was obtained by 8–14 Hz bandpass filtering. For each subject, the trials of the visual search task were sorted according to prestimulus alpha power and binned into quintiles. Mean prestimulus alpha power and mean RT were calculated for each subject and each quintile, and then were averaged over subjects.

Again, debriefing after the experiment confirmed that participants were not able to detect whether the metallic cylinder used during intervention was the real magnet or the sham (43.3% of correct guesses; Pearson χ^2 test, $p = 0.46$).

Statistical analyses

For the three experiments, alpha power or RT values exceeding 2.5 SDs from the group mean in each condition (baseline, intervention, or postintervention) were eliminated from further analyses (1.8%, 3.6%, and 2.4% of the alpha power data, respectively; and 2.3%, 2.9%, and 2.5% of the RT data, respectively). To avoid statistical power problems, a multiple imputation method was used to treat some missing values before computing the ANOVA. Data normality was assessed by using a Shapiro–Wilk test. Due to the low numbers of errors ($<3\%$) expressed by all subjects in Experiments 2 and 3, errors rate were not analyzed further.

In Experiment 1, the log-transformed relative alpha power—IAF \pm 2 Hz—was entered into a mixed ANOVA, separately for intervention and postintervention, with the between-subjects factor “group” (real vs sham), and the within-subjects factors “region” (occipital and parietal), “electrode” (left, O1 and P3; right, O2 and P4; central, POZ and Pz), and “time of stimulation” (arbitrary time bins T1, T2, T3, and T4). Note that the factor group was conservatively considered between subjects, despite the crossover design, to maintain the same statistical power between Experiment 1 and Experiment 3. Only occipital and parietal sites were included in this primary analysis due to the occipital localization of the magnet [POZ (occipital cortex close to the parietal cortex)] and the occipitoparietal origin of alpha oscillations modulated by visual inputs. Nonetheless, to test the spatial specificity of tSMS-dependent effects, the same ANOVAs were repeated with region (frontal and central) as a within-subject factor and with all other factors being equal. We also confirmed the alpha specificity of tSMS-dependent effects by performing the same ANOVA on delta (2–4 Hz), theta (4–6 Hz), alpha (7–14 Hz), and beta (15–30 Hz) bands. Note that, because of the impossibility of identifying individual peaks for all bands and all subjects, fixed-frequency bands were used for this analysis (we also conservatively reanalyzed the alpha band).

In Experiment 2, the median RTs (for correct trials only) were calculated for each condition (intervention and postintervention) in each subject and then entered into a repeated-measures mixed ANOVA. Group (real vs sham) was the between-subjects factor; and the presence of the target (present vs absent), the number of the stimuli in the display or set size (low vs high), and the type of distractor ratio (0:48, 6:42, 24:24, 42:6, and 48:0) were within-subject factors. Significant interaction effects involving the group factor were further analyzed with *post hoc t* test comparisons with Bonferroni correction and additional ANOVAs as appropriate.

In Experiment 3, alpha power analysis was conducted in the same way as in Experiment 1, including an additional analysis for the pause period. Similarly, behavioral analysis was performed as described for Experiment 2. In all cases, we used the same number of factors and levels. Additionally, the relationship between prestimulus alpha power and behavioral responses for both groups (real and sham) was further investigated using the single-trial analysis described in the data analysis section. All RT trials were separated into “easy task conditions” and “difficult task conditions” based on the distractor ratios showing significant differences between real and sham groups. The prestimulus alpha power and RT for easy and difficult task conditions were calculated for each subject in each quintile and then averaged over subjects. RTs were entered into a two-way mixed ANOVA, separately for easy and difficult task conditions, with quintile (within subjects) and group (between subjects) as factors.

Experiment 4 (control experiments and results)

Subjects and procedure. Effects of SMS on median nerve sensory action potential (SAP) recordings. We performed two separate control experi-

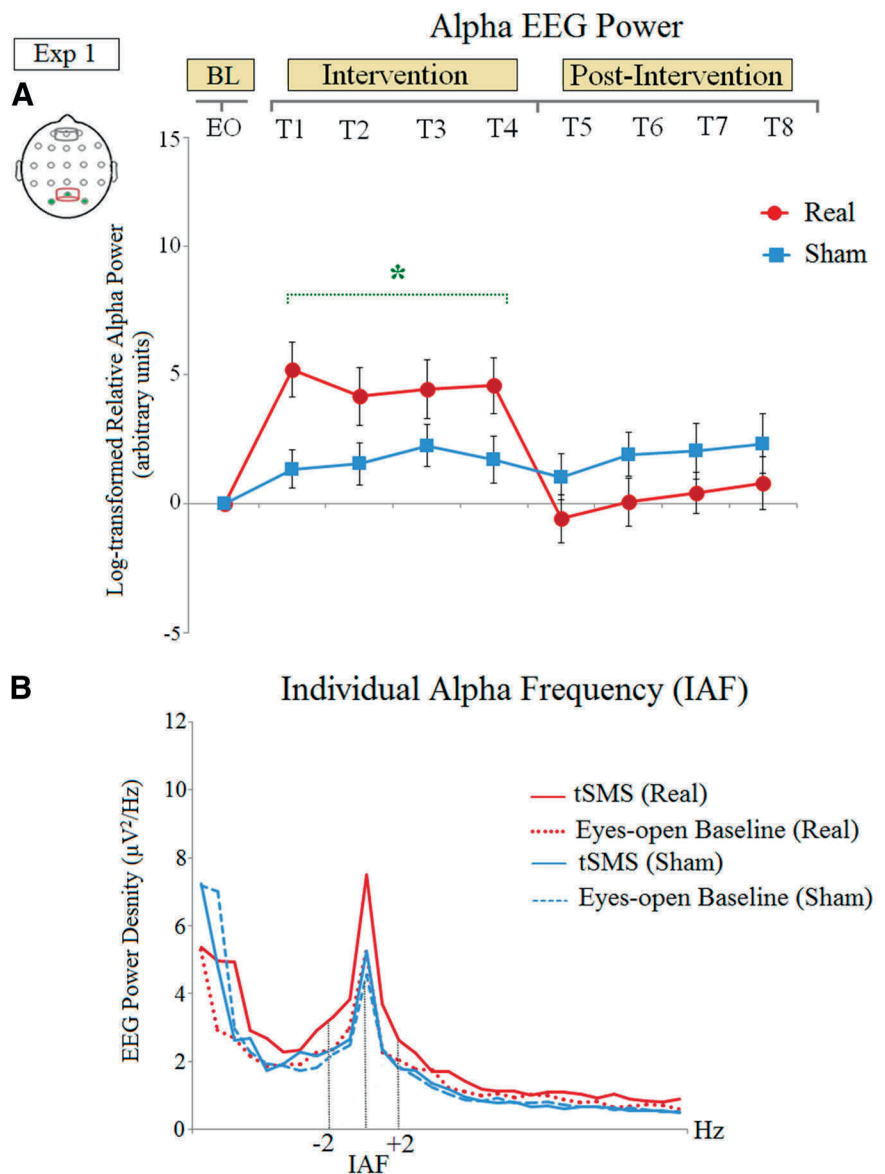


Figure 3. tSMS over the human visual cortex increases EEG alpha activity (Experiment 1). **A**, Real tSMS (red) over visual cortex during the 10 min intervention session induced a relative increase in alpha EEG power compared with sham (blue) stimulation in wakeful rest. Plotted relative alpha power pertains to the group average of the three occipital electrodes showing statically significant differences between groups after *post hoc* analysis and Bonferroni correction. These are highlighted in green on electrode scalp maps (top left) with the positions of the magnet and frontal counterweight also indicated. The *p* values (*) indicate the *post hoc* significance levels for the respective statistical comparisons region \times group (occipital region real vs sham: $p < 0.01$; see Table 1). Error bars here, and in all subsequent figures represent the SEM. EO, Eyes-open condition; BL, baseline. **B**, Group-averaged EEG activity estimated from peak IAF. The plot depicts the grand average of the transformed EEG spectral power density values at occipital sites (O1, O2, and POZ) for 2 min preceding (dotted lines) and during (solid lines) the intervention condition separately for the real (red) or sham (blue) tSMS groups. Real, but not sham, tSMS increased EEG alpha power (with alpha band defined here as IAF \pm 2 Hz) in visual areas. Exp, Experiment.

ments to exclude the possibility that SMS could interfere with the EEG recording system. Our first experiment (Experiment 4.1) was designed to investigate the possible effects of SMS on the SAP amplitude (we used a standard methodology to obtain median nerve SAP). A second experiment (Experiment 4.2) was designed to assess possible effects of SMS on artificially induced 8 Hz oscillations of the SAPs (we used a modified methodology to obtain median nerve SAPs at a frequency of 8 Hz). For both experiments (Experiments 4.1 and 4.2), the median nerve stimulation was performed using ring electrodes with conductive gel. The cathode was positioned proximally on the distal region of the middle phalanx of the third finger, and the anode on the distal phalanx of the same finger \sim 2 cm from the negative electrode. The stimulus consisted of 0.2 ms

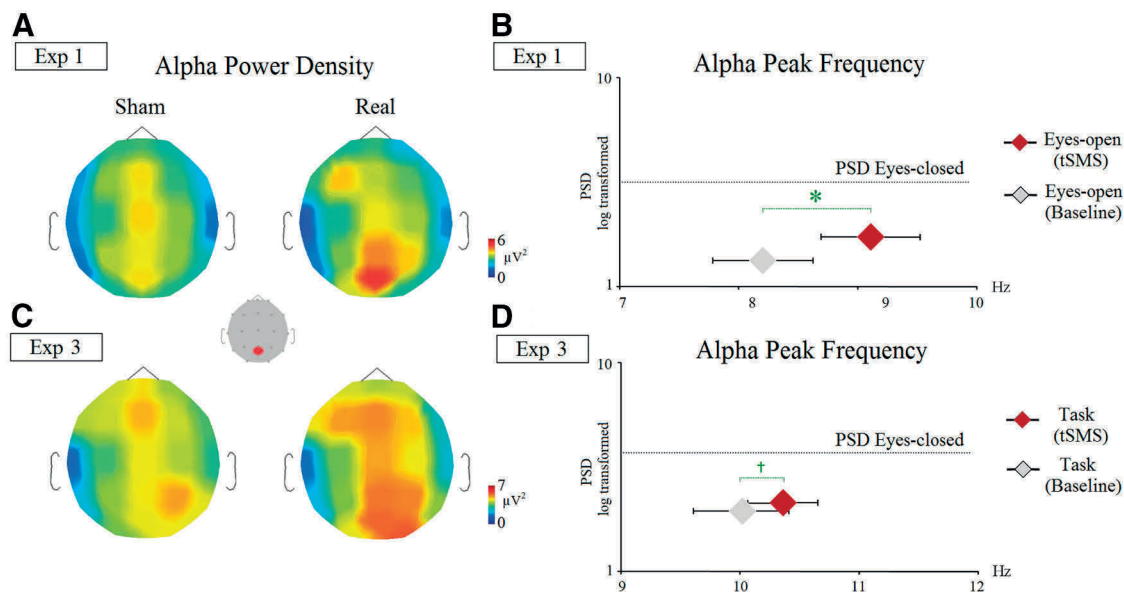


Figure 4. Alpha power density and alpha peak frequencies. **A, C**, Scalp topography of average EEG alpha power in sham and real groups during the tSMS intervention session in Experiment 1 (10 min eyes-open resting EEG) and Experiment 3 (performing the 10 min visual search task). Real relative to sham tSMS delivery over the visual cortex produced a focal, significant increase in scalp EEG alpha power at occipital sites in Experiment 1 (**A**), whereas alpha power was significantly higher over parietal-occipital sites in Experiment 3 (**C**). Because of the difference in the average amplitude of alpha power density during Experiment 1 (eyes-open resting EEG) and Experiment 3 (attentional task performance), and to maximize the visualization of the effects between real and sham conditions, the topographies of these two experiments were plotted on different scales. **B**, Peak frequency of the alpha rhythm in Experiment 1 was shifted from 8.2 Hz during eyes-open baseline to 9.1 Hz during real tSMS, which approaches the alpha peak of the eyes-closed baseline value (10.2 Hz). **D**, The same effect was observed in Experiment 3 comparing preintervention (task baseline) and intervention (tSMS) periods during the performance of the visual search task, although this did not reach significance. Exp, Experiment; PSD, power spectrum density. * $p = 0.03$; †statistical trend.

rectangular pulses. The intensity was chosen to obtain slightly submaximal SAP amplitude (to optimize the possibility to see amplitude changes). Recordings were obtained from 10 median nerves of five normal volunteers (four women; mean \pm SD age, 36.4 ± 7.4 years; age range, 29–44 years) for Experiment 4.1, and from 8 median nerves obtained from five normal volunteers (five women; mean age, 35.6 ± 6.2 years; age range, 29–44 years) for Experiment 4.2.

Experiment 4.1. A schematic of the experimental setup is shown in Figure 2A. SAP recordings were made using silver chloride cup electrodes located over the median nerve at the wrist. The stimulation frequency was 0.4 Hz, and stimuli were delivered for 300 s at baseline followed by two periods of 300 s during SMS. A total of 120 SAPs were obtained and averaged for baseline (5 min), and two blocks of 120 SAPs were obtained during the SMS (10 min). During the baseline period, the sham metallic cylinder was placed over the recording electrodes using a customized cardboard box. During SMS, the sham metallic cylinder was substituted with the rMag60. SAP amplitudes were virtually identical at baseline and during SMS (means are reported in Fig. 2B, and a representative subject is displayed in Fig. 2C).

Experiment 4.2. A schematic of the experimental setup is shown in Figure 2D. SAP recordings were made using two of the same EEG cap electrodes used for the EEG experiments. The two electrodes were located over the median nerve at the wrist. The stimulation protocol was a train of 40 stimuli at 8 Hz (5 s) followed by 30 s of rest (Fig. 2E). This protocol was repeated 17 times for baseline (10 min) and 17 times during the SMS (10 min). A total of 680 SAPs were obtained and averaged for baseline (10 min), and 680 SAPs were obtained during the SMS (10 min). During baseline, the sham metallic cylinder was placed over the recording electrodes as in Experiment 4.1. During the SMS, the sham metallic cylinder was substituted with the Mag60r. Again, SAP amplitudes evoked during baseline and during SMS were identical (Fig. 2F). Moreover, after stimulus artifact removal, we obtained a power spectrum from the 17 stimulation periods both at baseline and during SMS. Power spectra showed the artificially induced 8 Hz oscillations, and they were identical at baseline and during SMS (Fig. 2G). With these control experiments, we exclude the possibility that tSMS had any effects on the recording systems.

Table 1. EEG results

	Intervention	Postintervention
Experiment 1		
Group	$F_{(1,28)} = 2.2, p = 0.14$	$F_{(1,28)} = 2.6, p = 0.11$
Region \times group	$F_{(1,28)} = 6.7, p = \mathbf{0.01^*}$	$F_{(1,28)} = 1.0, p = 0.32$
Electrode \times group	$F_{(2,56)} = 0.1, p = 0.82$	$F_{(2,56)} = 0.7, p = 0.61$
Time \times group	$F_{(3,84)} = 1.5, p = 0.25$	$F_{(3,84)} = 0.2, p = 0.85$
Region \times electrode \times group	$F_{(2,56)} = 0.8, p = 0.45$	$F_{(2,56)} = 0.6, p = 0.69$
Region \times time \times group	$F_{(3,84)} = 0.2, p = 0.90$	$F_{(3,84)} = 0.2, p = 0.85$
Electrode \times time \times group	$F_{(6,168)} = 0.8, p = 0.54$	$F_{(6,168)} = 1.3, p = 0.32$
Region \times electrode \times time \times group	$F_{(6,108)} = 1.2, p = 0.30$	$F_{(6,108)} = 0.7, p = 0.60$
Experiment 3		
Group	$F_{(1,27)} = 0.7, p = 0.42$	$F_{(1,27)} = 0.1, p = 0.9$
Region \times group	$F_{(1,27)} = 1.3, p = 0.27$	$F_{(1,27)} = 0.2, p = 0.67$
Electrode \times group	$F_{(2,54)} = 4.7, p = \mathbf{0.01^*}$	$F_{(2,54)} = 2.1, p = 0.14$
Time \times group	$F_{(3,81)} = 3.6, p = \mathbf{0.02^*}$	$F_{(3,81)} = 0.5, p = 0.68$
Region \times electrode \times group	$F_{(2,54)} = 0.7, p = 0.48$	$F_{(2,54)} = 1.9, p = 0.17$
Region \times time \times group	$F_{(6,164)} = 0.4, p = 0.69$	$F_{(6,162)} = 2.4, p = 0.06†$
Electrode \times time \times group	$F_{(6,162)} = 1.9, p = 0.13$	$F_{(3,81)} = 3.4, p = \mathbf{0.04}$
Region \times electrode \times time \times group	$F_{(6,162)} = 0.5, p = 0.68$	$F_{(6,162)} = 1.5, p = 0.22$

ANOVA effects involving group factor in Experiments 1 and 3 during intervention and postintervention periods within the frequency range of the IAF and from occipitoparietal regions. Bold numbers indicate significant ANOVA effects. p values are shown after Greenhouse–Geisser correction.

*Highest-order interaction effect for significance that was used to explain our results after *post hoc* analysis.

†A statistical trend.

Results

Experiment 1—modulation of EEG alpha power by tSMS applied to the visual cortex

In Experiment 1, participants underwent either tSMS or sham tSMS on separate days in a within-subjects design (Fig. 1A). We recorded EEG activity in a 4 min baseline (2 min eyes closed and

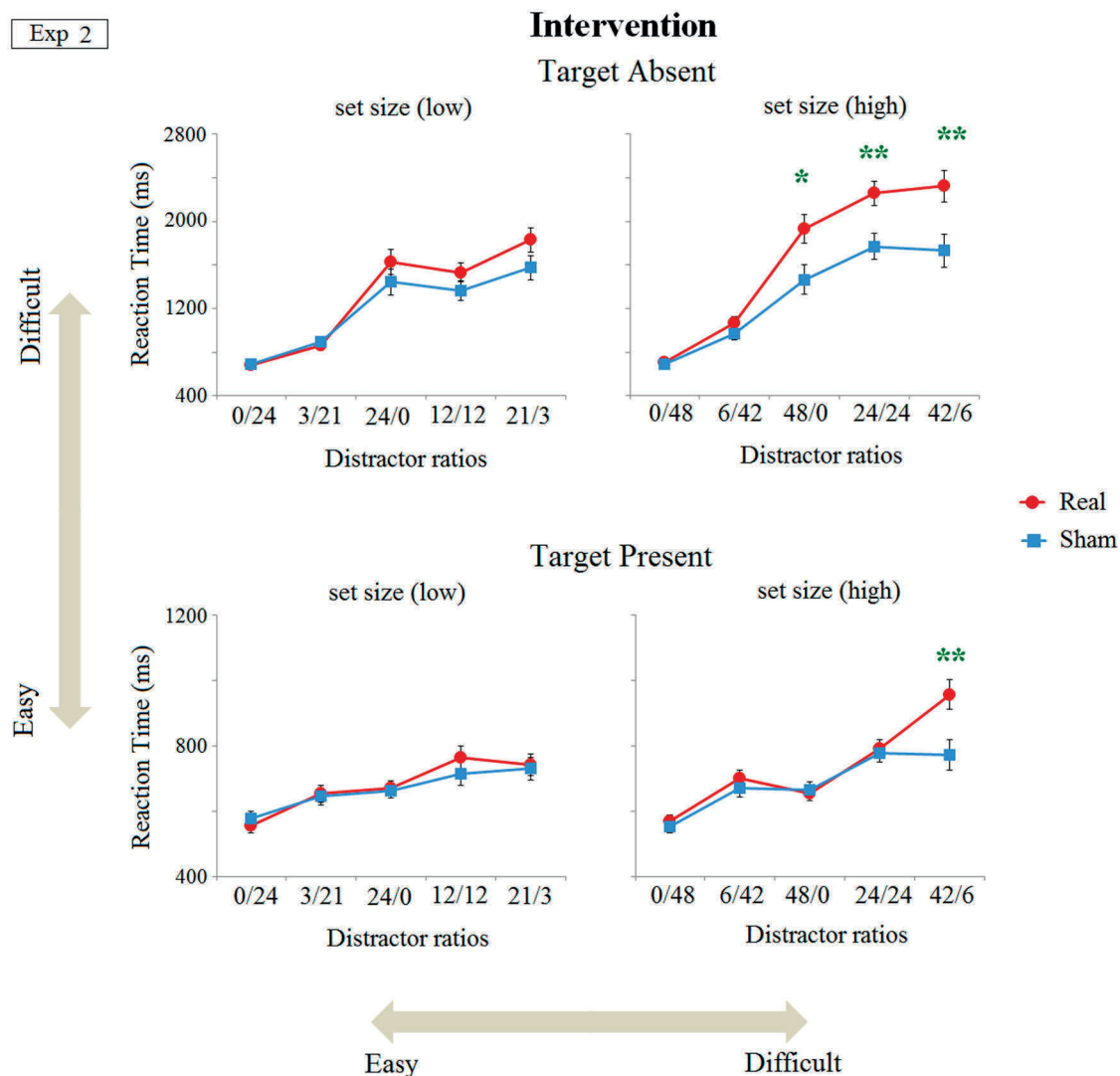


Figure 5. tSMS over the human visual cortex slows conjunctive visual search performance (Experiment 2). The median RT for correct hits for real and sham tSMS groups during the intervention session is plotted as a function of same-shape/same-color distractor (distractor ratio effect) and the number of stimuli in the display (set size) both for the target-absent (top panels) and target-present (bottom panels) conditions. Distractor ratios were ordered as a function of mean search times (i.e., RTs) of all participants. The *p* values indicate the *post hoc* significance levels for the respective statistical comparisons relative to the significant ANOVA interaction presence \times set size \times distractor \times group (see Table 2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. tSMS delivered over the visual cortex induced a slowing of RTs compared with sham tSMS when task conditions were more difficult, suggesting that real tSMS can modulate some aspects of conjunctive visual search governed by attentional top-down factors. Exp, Experiment.

2 min eyes open), followed by a 10 min intervention (real or sham) and by a 10 min postintervention period. Analyses were restricted to parietal and occipital electrodes, focusing on alpha-band activity (IAF, ± 2 Hz, log-transformed and normalized to eyes-open baseline values).

Strikingly, tSMS increased alpha EEG activity relative to sham tSMS during the intervention (Fig. 3A,B). This effect was spatially selective (interaction region \times group: $F_{(1,28)} = 6.7$, $p = 0.01$), being observed under tSMS over occipital ($p < 0.01$) but not parietal ($p = 0.73$) electrodes (Fig. 4A, Table 1). Alpha enhancement was evident in all four arbitrarily defined 2.5 min time windows (T1–T4) during the intervention session (Fig. 3A). Note that the tSMS-induced alpha power increase is a fraction of the massive alpha increase induced by eye closing (Niedermeyer, 1993; Wang, 2010; see Fig. 4B). Postintervention, alpha power immediately returned to values close to eyes-open baseline values (Fig. 3A). In addition, we observed that tSMS significantly increased not only the alpha power, but also the peak frequency of

the alpha rhythm, which shifted from (mean \pm SD) 8.2 ± 1.6 Hz during the eyes-open baseline period to 9.1 ± 1.6 Hz during the tSMS (paired *t* test, $p = 0.03$; Fig. 4B). The increase in alpha peak frequency is unlikely to be due to artifactual interference between tSMS and the EEG recording system. Any possible artifactual origin of the observed increase in alpha power was previously excluded in a separate control study (see Experiment 4 in Materials and Methods; Fig. 2). To further test the spatial specificity of the increase in EEG alpha power during tSMS, we repeated the same analysis on central and frontal electrodes, obtaining no significant differences between real and sham groups (group: $F_{(1,28)} = 0.11$; $p = 0.74$; region \times group: $F_{(1,28)} = 0.27$; $p = 0.61$). We also confirmed the frequency specificity of the tSMS-dependent power increase by repeating the same analysis for delta (2–4 Hz), theta (4–6 Hz), alpha (7–14 Hz), and beta (15–30 Hz) bands (fixed-frequency bands). tSMS had no significant effect on delta (group: $F_{(1,28)} = 0.8$; $p = 0.36$), theta (group: $F_{(1,28)} = 1.1$; $p = 0.30$), or beta (group: $F_{(1,28)} = 0.1$; $p = 0.85$) oscillations. How-

ever, in this analysis using fixed-frequency bands, we confirmed the tSMS-dependent power increase of alpha oscillations (group: $F_{(1,28)} = 5.4$; $p = 0.02$). We therefore show that the focal application of a static magnetic field over the visual cortex produces a spatially specific and frequency-specific increase in alpha power.

Experiment 2—modulation of behavioral performance by tSMS applied to the visual cortex during visual search

We next sought to characterize a functional correlate of the observed tSMS-dependent modulation of posterior alpha power. Participants were randomized to two groups (real and sham), adopting a between-subjects design (Fig. 1B and Materials and Methods). Participants completed a conjunction visual search task with a distractor—ratio manipulation (Wolfe et al., 1989; Poisson and Wilkinson, 1992), a perceptual task engaging visual selective attention (Bacon and Egeth, 1997; Müller and Krummenacher, 2006) in which participants were required to identify a target (an orange square) among two classes of distractors (orange triangles and/or blue squares). That is, the target was defined by a particular combination of two highly discriminable features (color and form), and shared one of these features with each of the distractors. To vary the degree of cognitive load, the following three parameters were randomly manipulated across trials (Fig. 1D): (1) the presence or absence of target (target presence); (2) the fixed total number of stimuli that were presented in the display (set size); and (3) the relative frequency of the two types of distractors (distractor ratio). Participants were required to locate the target stimulus as quickly as possible and to indicate target presence or absence via a two-alternative button press. The task was performed preintervention, during the intervention (real or sham), and postintervention. We measured both accuracy and RTs.

Across both groups (real or sham), we observed highly accurate target detection over all trial types ($99.1 \pm 1.0\%$ correct responses). As predicted, both groups were slower (longer RTs) for target-absent relative to present trials, and for more attention-demanding trials (high set size and more difficult distractor ratios; Fig. 5). Preintervention, RTs did not differ between the real and sham groups. However, during the intervention, real tSMS induced a significant slowing of RTs compared with sham tSMS (Table 2), specifically for the most difficult task conditions (Fig. 5), as follows: trials with target present, high set size, and 42:6 distractor ratio ($p < 0.01$), as well as trials with target absent, high set size, and 48:0 ($p = 0.02$), 24:24 ($p < 0.01$), and 42:6 ($p < 0.01$) distractor ratios. Aftereffects of tSMS in behavior were present despite no change in alpha power postintervention, but these were weak, as suggested by RTs remaining generally slower for trials with high set size in the real group compared with sham ($p = 0.03$; Table 2, Fig. 6A). Thus, a focal static magnetic field over the visual cortex significantly slowed RTs in a visual conjunction search task only for the most attention-demanding trials.

Experiment 3—combined modulation of alpha power and behavioral performance by tSMS

Our motivation for testing tSMS effects on visual target detection followed our observation that this intervention increases occipital alpha power (Experiment 1) and previous observations (Ergenoglu et al., 2004; Hanslmayr et al., 2007) that prestimulus alpha power correlates inversely with subsequent target detection. Thus, having confirmed the behavioral effect of occipital tSMS on target detection (Experiment 2), we next examined the relationship between the tSMS-dependent increase in RT and the

Table 2. Behavioral results

	Intervention	Postintervention
Experiment 2		
Group	$F_{(1,27)} = 4.8, p = 0.04$	$F_{(1,27)} = 3.9, p = 0.06†$
Presence × group	$F_{(1,27)} = 5.3, p = 0.03$	$F_{(1,27)} = 2.7, p = 0.11$
Set size × group	$F_{(1,27)} = 25.6, p < 0.01$	$F_{(1,27)} = 6.8, p = 0.01$
Distractor × group	$F_{(4,108)} = 4.4, p = 0.03$	$F_{(4,108)} = 2.1, p = 0.12$
Presence × set size × group	$F_{(1,27)} = 10.2, p = 0.03$	$F_{(1,27)} = 1.0, p = 0.33$
Presence × distractor × group	$F_{(4,108)} = 3.4, p = 0.01$	$F_{(4,108)} = 2.3, p = 0.09$
Set size × distractor × group	$F_{(4,108)} = 2.7, p = 0.05$	$F_{(4,108)} = 0.5, p = 0.58$
Presence × set size × distractor × group	$F_{(4,108)} = 2.7, p = 0.03*$	$F_{(4,108)} = 0.6, p = 0.53$
Experiment 3		
Group	$F_{(1,28)} = 6.8, p = 0.01$	$F_{(1,27)} = 0.5, p = 0.47$
Presence × group	$F_{(1,28)} = 5.8, p = 0.02$	$F_{(1,27)} = 0.6, p = 0.42$
Set size × group	$F_{(1,28)} = 6.5, p = 0.02$	$F_{(1,27)} = 3.9, p = 0.06†$
Distractor × group	$F_{(4,112)} = 6.7, p = 0.02$	$F_{(4,108)} = 1.0, p = 0.38$
Presence × set size × group	$F_{(1,28)} = 3.4, p = 0.07†$	$F_{(1,27)} = 6.7, p = 0.02$
Presence × distractor × group	$F_{(4,112)} = 3.3, p = 0.01$	$F_{(4,108)} = 1.4, p = 0.25$
Set size × distractor × group	$F_{(4,112)} = 5.4, p < 0.01$	$F_{(4,108)} = 1.1, p = 0.35$
Presence × set size × distractor × group	$F_{(4,112)} = 2.8, p = 0.03*$	$F_{(4,108)} = 2.3, p = 0.08†$

ANOVA effects involving group factor in Experiments 2 and 3 during intervention and postintervention periods. Bold numbers indicate significant ANOVA effects. p values are shown after Greenhouse–Geisser correction.

*Highest-order significant effect that was used to guide *post hoc* analyses.

†A statistical trend.

tSMS-dependent increase in prestimulus alpha power, on a single-trial basis. Therefore, in Experiment 3 we repeated the visual search task while simultaneously recording EEG (Fig. 1C). The experimental paradigm was virtually identical to the combination of Experiments 1 and 2, except that the design was double blind (both subjects and experimenter were blind to the intervention), as in Experiments 1 and 2. Two brief pauses were also introduced during task performance, during which eyes-open resting EEG activity was recorded (Fig. 1C), leading to a longer intervention (12 min).

The results of Experiment 3 replicate and extend the main results obtained separately in Experiments 1 and 2. First, the main electrophysiological effect of tSMS delivered over the visual cortex was replicated, confirming the increase in alpha activity compared with sham tSMS during the intervention (Fig. 7A,B), with slightly later onset and a more right-lateralized effect compared with Experiment 1 (Fig. 4C, Table 1). These latter differences between experiments likely reflect the different experimental condition (task vs rest). Note that the differences between real and sham tSMS during the 2 min rest pauses between tasks did not reach statistical significance (Fig. 7A), likely reflecting a different resting condition compared with Experiment 1. The spatial specificity of the increase in EEG alpha power during tSMS was confirmed by the absence of significant differences between real and sham groups at central and frontal electrodes (group: $F_{(1,27)} = 0.3$; $p = 0.61$), $p = 0.31$; region × group: $F_{(1,27)} = 0.2$; $p = 0.66$). The frequency specificity was also confirmed by the absence of tSMS-dependent differences for delta and beta oscillations, respectively (group: $F_{(1,27)} = 1.6$; $p = 0.22$; and group: $F_{(1,27)} = 0.2$; $p = 0.67$). A trend for increased theta oscillations was observed during real tSMS compared with sham tSMS (electrode × group: $F_{(1,27)} = 3.7$; $p = 0.07$), likely due to the left tail of alpha-band activity, which again showed a tSMS-dependent power increase (region × electrode × group: $F_{(2,54)} = 5.4$; $p > 0.01$).

Second, the behavioral effect of tSMS was also replicated, with slower RTs compared with sham tSMS specifically for the most

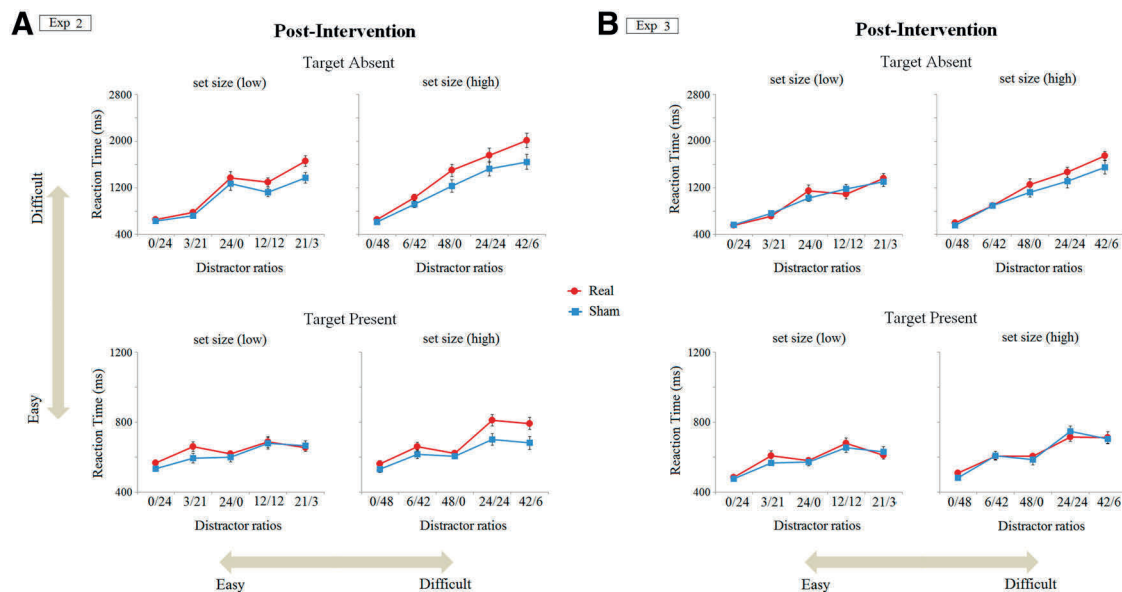


Figure 6. RTs during the postintervention. **A, B.** The median hit RT for real and sham tSMS groups during the postintervention period for Experiment 2 (**A**) and Experiment 3 (**B**). RTs are displayed as a function of same-shape/same-color distractor (distractor ratio effect), and the number of stimuli in the display (set size) both for the target-absent (top panels) and target-present (bottom panels) conditions. During the performance of the visual search task after the intervention period, most of the statistical differences between real and sham groups were no longer present, or only reached a statistical trend. In this respect, in Experiment 2, the ANOVA revealed a significant set size \times group interaction ($F_{(1,27)} = 6.8$; $p = 0.01$), with the real tSMS group taking longer to respond than the sham tSMS group for high set size trials ($p = 0.03$), but not for low set size trials ($p = 0.12$; significant interaction is not indicated). In Experiment 3, during the postintervention, there was a statistically significant presence \times set size \times group interaction ($F_{(1,27)} = 6.7$, $p = 0.02$), but no *post hoc* test reached significance. Exp, Experiment.

difficult task conditions (Fig. 7C, Table 2): target-present, high set size, and 42: 6 distractor ratio ($p < 0.01$); and target absent, high set size, and 0: 48 ($p = 0.03$), 24:24 ($p = 0.03$), and 42:6 distractor ratios ($p < 0.01$; Fig. 7C). No EEG and minimal behavioral effects were observed during the postintervention session (Fig. 6B, Table 2).

To investigate the relationship between tSMS-dependent modulation of alpha activity and behavioral performance, we next conducted a joint single-trial analysis of prestimulus alpha power and RT during the intervention session. In both groups, we confirmed the relationship between prestimulus posterior alpha-band power and RT described previously (Klimesch et al., 2007a; Snyder and Foxe, 2010; i.e., greater alpha power associated with slower response), particularly for more attention-demanding trials (difficult task conditions: quintile: $F_{(4,108)} = 54.8$; $p < 0.01$; Fig. 7D). During tSMS, this relationship was shifted toward higher values of prestimulus alpha power, consequently leading to longer reaction times compared with sham tSMS in difficult task conditions (group: $F_{(1,27)} = 5.1$; $p < 0.01$), but not in easy task conditions (group: $F_{(1,27)} = 0.3$; $p = 0.64$; Fig. 7D). Even though additional mechanisms cannot be excluded, these data establish a correlative link between increased alpha power and decreased behavioral performance during tSMS.

Discussion

Overall, our data show that tSMS applied to the visual cortex increases alpha oscillations (Experiment 1) and induces behavioral effects in humans (Experiment 2). Importantly, we experimentally discarded the possibility that the increased alpha oscillations could be due to artifactual interference between tSMS and the EEG recording system (control experiments). The electrophysiological and behavioral effects of tSMS were replicated by simultaneous recording of visual search performance and EEG activity with a double-blind design (Experiment 3), demonstrating the robustness of our findings. These

data suggest that the tSMS-dependent slowing of performance in a highly attention-demanding visual search is related to an increase of alpha oscillations.

Our first experiment demonstrated that tSMS interacts with the normal alpha oscillatory EEG activity of the occipital cortex during eyes-open rest. This interaction was fast (within minutes), lasted for the stimulation period, and disappeared postintervention, suggesting that tSMS can alter the relationship between a state of resting wakefulness and the presence of a dominant alpha rhythm in the EEG. Importantly, the effect was both spatially localized and frequency specific (i.e., we did not observe any tSMS-dependent power increases at delta, theta, or beta frequencies). Because increased occipital alpha activity reflects a state of reduced cortical excitability (Romei et al., 2008a,b), our results are in agreement with previous human studies demonstrating tSMS-induced reduction of motor cortex excitability (Oliviero et al., 2011; Silbert et al., 2013). During tSMS, alpha oscillations not only increased in amplitude, suggesting an increased number of neurons participating in the oscillations (Hindriks and van Putten, 2013), but also were right shifted in frequency, which could reflect a reduced temporal spacing of spikes underlying the oscillations (Hindriks and van Putten, 2013). At the cellular level, animal experiments have previously shown that static magnetic fields directly interfere with the functioning of membrane ion channels and consequently with the generation of action potentials (Rosen and Lubowsky, 1987; Coots et al., 2004; Yang et al., 2011). Therefore, tSMS could affect the delicate equilibrium between synchronous excitatory and inhibitory inputs at cortical pyramidal dendrites, thereby altering the large-scale spontaneous fluctuations of ongoing cortical (alpha) activity.

Our second experiment demonstrated that tSMS during a visual search task affects behavioral performance, specifically slowing the detection of a target stimulus among distractors. Critically, the slower performance (compared with sham) only

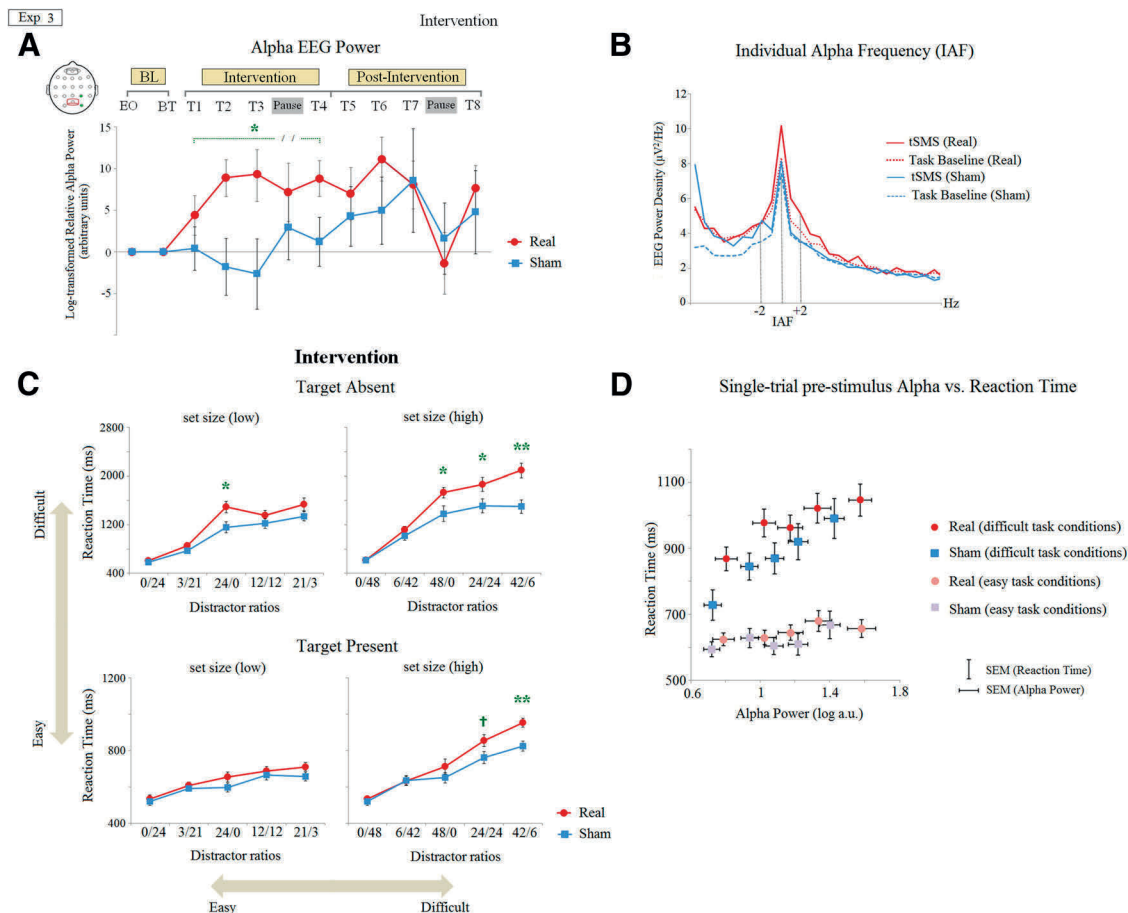


Figure 7. Prestimulus alpha oscillations predict conjunctive visual search performance (Experiment 3). **A**, Real-tSMS (red) over visual cortex during the 12 min intervention session induced a relative increase in alpha EEG power compared with sham tSMS (blue) during visual search. Plot illustrates the enhancement in the relative alpha power for electrodes (highlighted in green on electrode scalp maps, as well as their position relative to the magnet) showing statically significant differences between groups after *post hoc* Bonferroni adjustment (electrode \times group; right electrodes real vs sham: $*p = 0.01$; see Table 1). **B**, Group-averaged EEG activity estimated from individual peak alpha frequency. Real, but not sham, tSMS increased EEG alpha power ($IAF \pm 2$ Hz) in visual areas. Plots depict the grand average of the transformed EEG spectral power density values at occipital sites (O2 and POz) for 2 min preceding (dotted lines) and during (solid lines) the intervention condition separately for the real (red) or sham (blue) tSMS groups. **C**, Effects of tSMS on visual search performance were replicated in Experiment 3: tSMS-induced slowing of visual search (mean RT for corrects hits) is observed when there are a higher number of same-shape and same-color distractors. Asterisks (*) represent significant *post hoc* comparisons for the interaction presence \times set size \times distractor \times group (see Table 2). **D**, Pooled single-trial data demonstrating a monotonic relationship between prestimulus alpha power and RT. For each subject, all correct hit trials during the intervention session were separately sorted according to prestimulus alpha power and were binned into quintiles. For each quintile, mean alpha power (collapsed over occipital electrodes) and mean RT were calculated. Conditions showing significant behavioral effects (difficult distractor ratios vs easy distractor ratios) between groups were collapsed, and separately calculated and plotted. Alpha power of the quintile scores are displayed in log scale. The typical relationship between alpha power and performance, observed during the difficult task conditions, was shifted toward higher values of prestimulus alpha power during tSMS, at least partly explaining the tSMS-induced increase in RTs. In all plots, p values indicate the *post hoc* significance levels for the respective statistical comparisons. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, \dagger trend. EO, Eyes-open condition; Exp, experiment; a.u., arbitrary units.

emerged on trials with the most difficult task conditions. Previous visual search studies have suggested that the detection of relatively easy targets relies upon bottom-up mechanisms, whereas the detection of more difficult targets requires top-down control (Nakayama and Silverman, 1986; Treisman and Sato, 1990; Shen et al., 2007) over the visual cortex from higher-order attention areas (Donner et al., 2002; Kalla et al., 2009; Wei et al., 2011). Our findings are compatible with a view that the decrease of cortical excitability induced by tSMS of the visual cortex does not affect the basic bottom-up processing of visual inputs, but it does interfere with the more sophisticated ability of higher-order attention areas to control the visual cortex.

In our third experiment, we directly linked the tSMS-induced EEG and behavioral changes by replicating the visual search task while simultaneously recording the EEG. A separate line of evidence suggests that top-down attentional processing during visual search and tasks requiring visuospatial attention involves the suppression of alpha activity in visual cortex (Thut et al., 2006;

Min and Herrmann, 2007; Capotosto et al., 2009; Roberts et al., 2014). Joint single-trial analysis confirmed the known relationship between alpha power and reaction time (i.e., the more the alpha power, the slower the response). Importantly, in easy task conditions the RTs were only slightly slower with higher alpha power, whereas in difficult task conditions the RTs were considerably slower with higher alpha power, likely due to the contribution of top-down processing (Min and Herrmann, 2007; Roberts et al., 2014). This explains why, even though tSMS increased the alpha power for all task conditions, it produced a significant slowing of reaction times only for the most difficult task conditions. Therefore, the selective tSMS effect on difficult—but not easy—target detection is consistent with the visual cortex becoming less sensitive to top-down control from higher-order attentional areas, at least partly due to the tSMS-induced increase of posterior alpha activity.

Based on these findings, we speculate that the most likely mechanism through which tSMS evokes the observed behavioral

effects is a transient synchronization of corticostriatal neural generators of alpha activity. Additional mechanisms can obviously not be excluded. In this sense, it is worth noting that the tSMS-induced effects on EEG alpha activity disappeared in the postintervention period, whereas the effects of tSMS on behavior lasted longer, in agreement with previous findings of tSMS on the excitability of the human sensorimotor cortex (Oliviero et al., 2011; Silbert et al., 2013; Kirimoto et al., 2014). Even though the full mechanisms of these alterations remain to be fully established, the present data show that tSMS affects both alpha EEG activity and human behavioral performance. In comparison with other noninvasive neuromodulation techniques, such as transcranial direct current stimulation or repetitive TMS (Paulus et al., 2013), tSMS induces these electrophysiological and behavioral effects without using any electrical current or time-varying magnetic pulses.

We conclude that focal static magnetic fields can interfere with normal brain function even at an intensity of 120–200 mT (at 2–3 cm from the magnet surface), offering a novel safe technique, which is both portable and inexpensive, to influence human brain activity and behavior.

References

- Aguila J, Cudeiro J, Rivadulla C (2014) Effects of static magnetic fields on the visual cortex: reversible visual deficits and reduction of neuronal activity. *Cereb Cortex*. Advance online publication. Retrieved May 14, 2015. doi:10.1093/cercor/bhu228. [CrossRef Medline](#)
- Bacon WJ, Egeth HE (1997) Goal-directed guidance of attention: evidence from conjunctive visual search. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 23: 948–961. [CrossRef Medline](#)
- Barry RJ, Clarke AR, Johnstone SJ, Magee CA, Rushby JA (2007) EEG differences between eyes-closed and eyes-open resting conditions. *Clin Neurophysiol* 118:2765–2773. [CrossRef Medline](#)
- Basar E (1980) EEG brain dynamics. Relation between EEG and brain evoked potentials. Amsterdam: Elsevier
- Capotosto P, Babiloni C, Romani GL, Corbetta M (2009) Frontoparietal cortex controls spatial attention through modulation of anticipatory alpha rhythms. *J Neurosci* 29:5863–5872. [CrossRef Medline](#)
- Coots A, Shi R, Rosen AD (2004) 0.5-T static magnetic field on conduction in guinea pig spinal cord. *J Neurol Sci* 222:55–57. [CrossRef Medline](#)
- Donner TH, Kettermann A, Diesch E, Ostendorf F, Villringer A, Brandt SA (2002) Visual feature and conjunction searches of equal difficulty engage only partially overlapping frontoparietal networks. *Neuroimage* 15:16–25. [CrossRef Medline](#)
- Dugué L, Marque P, VanRullen R (2011) The phase of ongoing oscillations mediates the causal relation between brain excitation and visual perception. *J Neurosci* 31:11889–11893. [CrossRef Medline](#)
- Ergenoglu T, Demiralp T, Bayraktaroglu Z, Ergen M, Beydagi H, Uresin Y (2004) Alpha rhythm of the EEG modulates visual detection performance in humans. *Brain Res Cogn Brain Res* 20:376–383. [CrossRef Medline](#)
- Foxe JJ, Snyder AC (2011) The role of alpha-band brain oscillations as a sensory suppression mechanism during selective attention. *Front Psychol* 2:154. [CrossRef Medline](#)
- Foxe JJ, Simpson GV, Ahlfors SP (1998) Parieto-occipital approximately 10 Hz activity reflects anticipatory state of visual attention mechanisms. *Neuroreport* 9:3929–3933. [CrossRef Medline](#)
- Häfel U (2007) The history of magnetism in medicine. In: *Magnetism in medicine: a handbook*, Ed 2 (Andra W, Nowak H, eds), pp 3–25. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Hanslmayr S, Aslan A, Staudigl T, Klimesch W, Herrmann CS, Bäuml KH (2007) Prestimulus oscillations predict visual perception performance between and within subjects. *Neuroimage* 37:1465–1473. [CrossRef Medline](#)
- Hindriks R, van Putten MJ (2013) Thalamo-cortical mechanisms underlying changes in amplitude and frequency of human alpha oscillations. *Neuroimage* 70:150–163. [CrossRef Medline](#)
- Kalla R, Muggleton NG, Cowey A, Walsh V (2009) Human dorsolateral prefrontal cortex is involved in visual search for conjunctions but not features: a theta TMS study. *Cortex* 45:1085–1090. [CrossRef Medline](#)
- Kirimoto H, Tamaki H, Matsumoto T, Sugawara K, Suzuki M, Oyama M, Onishi H (2014) Effect of transcranial static magnetic field stimulation over the sensorimotor cortex on somatosensory evoked potentials in humans. *Brain Stimul* 7:836–840. [CrossRef Medline](#)
- Klimesch W (1999) EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev* 29:169–195. [CrossRef Medline](#)
- Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S (2007a) EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain Res Rev* 53:63–88. [CrossRef Medline](#)
- Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S, Gruber W, Freunberger R (2007b) Event-related phase reorganization may explain evoked neural dynamics. *Neurosci Biobehav Rev* 31:1003–1016. [CrossRef Medline](#)
- Makeig S, Bell AJ, Jung T-P, Sejnowski TJ (1996) Independent component analysis of electroencephalographic data. In: *Advances in neural information processing systems*, Vol 8 (Touretzky D, Mozer M, Hasselmo M, eds), pp 145–151. Cambridge, MA: MIT.
- McLean MJ, Engström S, Holcomb RR, Sanchez D (2003) A static magnetic field modulates severity of audiogenic seizures and anticonvulsant effects of phenytoin in DBA/2 mice. *Epilepsy Res* 55:105–116. [CrossRef Medline](#)
- McLean MJ, Engström S, Qinkun Z, Spankovich C, Polley D (2008) Effects of a static magnetic field on audiogenic seizures in black Swiss mice. *Epilepsy Res* 80:119–131. [CrossRef Medline](#)
- Min BK, Herrmann CS (2007) Prestimulus EEG alpha activity reflects prestimulus top-down processing. *Neurosci Lett* 422:131–135. [CrossRef Medline](#)
- Min BK, Busch NA, Debener S, Kranczioch C, Hanslmayr S, Engel AK, Herrmann CS (2007) The best of both worlds: phase-reset of human EEG alpha activity and additive power contribute to ERP. *Int J Psychophysiol* 65:58–68. [CrossRef Medline](#)
- Müller HJ, Krummenacher J (2006) Visual search and selective attention. *Vis Cogn* 14:389–410. [CrossRef](#)
- Nakayama K, Silverman GH (1986) Serial and parallel processing of visual feature conjunctions. *Nature* 320:264–265. [CrossRef Medline](#)
- Niedermeyer E (1993) The normal EEG of the waking adult. In: *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields* (Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds), pp 97–117. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Oliviero A, Mordillo-Mateos L, Arias P, Panyavin I, Foffani G, Aguilar J (2011) Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol* 589:4949–4958. [CrossRef Medline](#)
- Oliviero A, Carrasco-López MC, Campolo M, Perez-Borrego YA, Soto-León V, Gonzalez-Rosa JJ, Higuero AM, Strange BA, Abad-Rodriguez J, Foffani G (2014) Safety study of transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) of the human cortex. *Brain Stimul*. Advance online publication. Retrieved May 14, 2015. doi:10.1016/j.brs.2014.12.002. [CrossRef Medline](#)
- Paulus W, Peterchev AV, Ridding M (2013) Transcranial electric and magnetic stimulation: technique and paradigms. *Handb Clin Neurol* 116: 329–342. [CrossRef Medline](#)
- Pfurtscheller G (2001) Functional brain imaging based on ERD/ERS. *Vision Res* 41:1257–1260. [CrossRef Medline](#)
- Pfurtscheller G (2003) Induced oscillations in the alpha band: functional meaning. *Epilepsia* 44 [Suppl 12]:2–8. [Medline](#)
- Poisson ME, Wilkinson F (1992) Distractor ratio and grouping processes in visual conjunction search. *Perception* 21:21–38. [CrossRef Medline](#)
- Rivadulla C, Foffani G, Oliviero A (2014) Magnetic field strength and reproducibility of neodymium magnets useful for transcranial static magnetic field stimulation of the human cortex. *Neuromodulation* 17:438–441. [CrossRef Medline](#)
- Roberts DC, Marcelli V, Gillen JS, Carey JP, Della Santina CC, Zee DS (2011) MRI magnetic field stimulates rotational sensors of the brain. *Curr Biol* 21:1635–1640. [CrossRef Medline](#)
- Roberts DM, Fedota JR, Buzzell GA, Parasuraman R, McDonald CG (2014) Prestimulus oscillations in the alpha band of the EEG are modulated by the difficulty of feature discrimination and predict activation of a sensory discrimination process. *J Cogn Neurosci* 26:1615–1628. [CrossRef Medline](#)
- Romei V, Brodbeck V, Michel C, Amedi A, Pascual-Leone A, Thut G (2008a) Spontaneous fluctuations in posterior alpha-band EEG activity reflect variability in excitability of human visual areas. *Cereb Cortex* 18:2010–2018. [CrossRef Medline](#)

- Romei V, Rihs T, Brodbeck V, Thut G (2008b) Resting electroencephalogram alpha-power over posterior sites indexes baseline visual cortex excitability. *Neuroreport* 19:203–208. [CrossRef Medline](#)
- Rosen AD (2003) Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys* 39:163–173. [CrossRef Medline](#)
- Rosen AD (2010) Studies on the effect of static magnetic fields on biological systems. *PIERS Online* 6:133–136. [CrossRef](#)
- Rosen AD, Lubowsky J (1987) Magnetic field influence on central nervous system function. *Exp Neurol* 95:679–687. [CrossRef Medline](#)
- Rosen AD, Lubowsky J (1990) Modification of spontaneous unit discharge in the lateral geniculate body by a magnetic field. *Exp Neurol* 108:261–265. [CrossRef Medline](#)
- Shen J, Reingold EM, Pomplun M (2003) Guidance of eye movements during conjunctive visual search: the distractor-ratio effect. *Can J Exp Psychol* 57:76–96. [CrossRef Medline](#)
- Shen J, Elahipanah A, Reingold EM (2007) Effects of context and instruction on the guidance of eye movements during a conjunctive visual search task. In: *Eye movements: a window on mind and brain* (van Gompel R, Fischer M, Murray W, Hill R, eds), pp 597–616. Oxford: Elsevier.
- Silbert BL, Pevcic DD, Patterson HI, Windnagel KA, Thickbroom GW (2013) Inverse correlation between resting motor threshold and corticomotor excitability after static magnetic stimulation of human motor cortex. *Brain Stimul* 6:817–820. [CrossRef Medline](#)
- Snyder AC, Foxe JJ (2010) Anticipatory attentional suppression of visual features indexed by oscillatory alpha-band power increases: a high-density electrical mapping study. *J Neurosci* 30:4024–4032. [CrossRef Medline](#)
- Thut G, Nietzel A, Brandt SA, Pascual-Leone A (2006) Alpha-band electroencephalographic activity over occipital cortex indexes visuospatial attention bias and predicts visual target detection. *J Neurosci* 26:9494–9502. [CrossRef Medline](#)
- Treisman A, Sato S (1990) Conjunction search revisited. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 16:459–478. [CrossRef Medline](#)
- van Dijk H, Schoffelen JM, Oostenveld R, Jensen O (2008) Prestimulus oscillatory activity in the alpha band predicts visual discrimination ability. *J Neurosci* 28:1816–1823. [CrossRef Medline](#)
- VanRullen R, Macdonald JS (2012) Perceptual echoes at 10 Hz in the human brain. *Curr Biol* 22:995–999. [CrossRef Medline](#)
- Wang XJ (2010) Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiol Rev* 90:1195–1268. [CrossRef Medline](#)
- Wei P, Müller HJ, Pollmann S, Zhou X (2011) Neural correlates of binding features within- or cross-dimensions in visual conjunction search: an fMRI study. *Neuroimage* 57:235–241. [CrossRef Medline](#)
- Wieraszko A (2000) Dantrolene modulates the influence of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. *Bioelectromagnetics* 21:175–182. [CrossRef Medline](#)
- Wolfe JM, Cave KR, Franzel SL (1989) Guided search: an alternative to the feature integration model for visual search. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 15:419–433. [CrossRef Medline](#)
- Wu LQ, Dickman JD (2012) Neural correlates of a magnetic sense. *Science* 336:1054–1057. [CrossRef Medline](#)
- Yang Y, Yan Y, Zou X, Zhang C, Zhang H, Xu Y, Wang X, Janos P, Yang Z, Gu H (2011) Static magnetic field modulates rhythmic activities of a cluster of large local interneurons in *Drosophila* antennal lobe. *J Neurophysiol* 106:2127–2135. [CrossRef Medline](#)

New Insights From Clinical Assessment of Upper Extremities in Cervical Traumatic Spinal Cord Injury

Carmen Carrasco-López,^{1,*} Samuel Jimenez,^{1,2,3,*} Maria Carmen Mosqueda-Pozon,¹
Yolanda A. Pérez-Borrego,¹ Monica Alcobendas-Maestro,⁴
Tomas Gallego-Izquierdo,³ Ana Esclarin-Ruz,⁴ and Antonio Oliviero¹

Abstract

Upper extremity function has a strong impact on the quality of life in cervical spinal cord-injured patients. Upper extremity function depends on many factors, such as muscle strength, level of lesion, and extension of the cord damage in its axial axis produced by the injury. These variables can be obtained by the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury, which is the standard for the functional evaluation of traumatic spinal cord injury (SCI) patients. The aim of this study was to describe the relationship between upper limb muscle strength, level of injury, and axial damage with the functionality of upper limb measured using the Jebsen-Taylor Hand Function Test (JTHFT) and the 9 Hole Peg Test (9HPT) in cervical SCI. Twenty-nine patients were included in this study. Our results suggest that both the JTHFT and 9HPT can be similarly used to quantify functional impairment after cervical SCI. Moreover, our data suggest that the upper extremity motor score, JTHFT, and 9HPT strongly correlate with the American Spinal Injury Association (ASIA) impairment scale (graded from A to E), but not with the lesion level. Our findings can be of great importance for the clinician or researchers whose therapeutic interventions have as a main objective to improve upper limb functionality in patients with cervical SCI. We suggest that ASIA impairment scale, ASIA motor score, and functional tests (including JTHFT and/or 9HPT) could be used as outcome measures in cervical SCI clinical trials.

Key words: ASIA; cervical; hand motor function; SCI; tetraplegia

Introduction

SPINAL CORD INJURY (SCI) HAS A GREAT IMPACT ON THE quality of life of affected people.¹ The functionality of the upper limb has a considerable impact on the quality of life of the patient with cervical SCI. In fact, 75–80% of these patients indicated that an important to very important improvement in the quality of their lives was related to an improvement in hand function.² Therefore, attending to the incidence of the cervical SCI and the impact of the functionality of the upper limb function in their quality of life, it seems relevant to wonder about the evaluation, rehabilitation treatments, and future restorative approaches of the functionality of the upper limb in tetraplegic patients.

The American Spinal Injury Association (ASIA) scale is the standard evaluation of the SCI patients; it includes muscle function grading, sensory grading, lesion level, and ASIA impairment scale (AIS). AIS is used to classify the patients in five main groups (A–E).³ It would be conceivable that upper limb functions should be related

to the cervical lesion level and to the AIS. However, some authors suggest that the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI), the level of lesion, and the ASIA impairment scale are not linked with the functionality of the upper limb.⁴ It also has been suggested that other factors, such as strength, sensibility, or even the motivation of the patient, is more related to this functionality in the upper limb.⁵

The aim of this study was to examine the relationship between lesion level, AIS, and muscle strength on the hand function in subjects with cervical SCI. We estimated the severity of SCI using the AIS (A–E). We evaluated the lesion level and the AIS following the ASIA scale guidelines and we quantified the upper limb motor score by using the upper limb motor score of the ASIA scale.

Moreover, we evaluated hand function using the Jebsen-Taylor Hand Function Test (JTHFT) and the Nine Hole Peg Test (9HPT). The JTHFT is a standardized measure for assessment of hand function that is reliable and valid for use with SCI subjects.^{6,7} The

¹FENNSI Group, ⁴Rehabilitation Department, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain.

²Physiotherapy Department, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

³Physiotherapy Department, Alcalá de Henares University, Spain.

*These authors contributed equally to the paper.

9-HPT is a brief standardized and quantitative test of upper extremity function.⁷

It is important to note that general function in SCI patients is frequently measured using the Functional Independence Measure (FIM) and/or the Spinal Cord Independence Measure (SCIM). However, these tests refer to the general situation of the patient and his/her relationship with the environment. Often, FIM and SCIM are considered to provide an indirect measure of upper limb functions (self-care and mobility sub-sections). On the other hand, these tests do not specifically evaluate hand function. Therefore, we decided to test JTHFT and 9HPT, which have been extensively validated in other neurological disorders, as more reliable tests for upper limb function.

Twenty-nine SCI subjects participated in this study: 21 men, eight women (mean age, 40.3 ± 15.3 years). The inclusion criteria were cervical SCI rostral to T1 and age of 18 to 70 years. Cervical SCI classified as central cord syndrome were excluded ($n=2$). Patients provided informed consent and the study was approved by the local ethical committee. We used the ISNCSCI to classify subjects.³

Hand function assessment tests

Upper extremity motor score. The ASIA Motor Index Score uses standard manual muscle testing on a 6-grade scale: absent=0; trace=1, visible or palpable contraction; poor=2, active movement through range of motion with gravity eliminated; fair=3, active movement through range of motion against gravity; good=4, active movement through range of motion against resistance; normal=5; and NT=not testable. The key muscles/functions included in the ASIA Motor Index Score are elbow flexors, wrist extensors, elbow extensors, finger flexors, hand intrinsic, hip flexors, knee extensors, ankle dorsi flexors, long toe extensors, and ankle plantar flexors, with a possible total motor score of 100. The motor score was obtained from the clinical reports of the patients. For analysis purpose, we used only the upper limb subscore (score from 0 to 50). We will refer to this variable as the upper extremity motor score (UEMS).

JTHFT. The JTHFT is a standardized measure that consists of seven functional tasks that require finger and hand movement. The JTHFT is a widely used for the assessment of functional hand motor skills.⁷⁻⁹ It has good validity and reliability, and normative data are available for different ages and both genders.^{8,9} The seven JTHFT tasks to be addressed are: turning over cards; picking up small objects and placing them in a can; picking up small objects with a teaspoon and placing them in a can mimicking a feeding function; stacking checkers; moving large light cans; moving heavy cans; and a writing task. Patients were instructed to perform the tasks as rapidly and accurately as possible according to written standardized instructions in the testing set.⁸⁻¹⁰ Total JTHFT time and partial subtest JTHFT times were recorded for analysis. Feedback on task performance was not provided. Dropping of an object (cards, small objects, and cans) was counted as an accuracy error and analyzed off-line. In our case, the writing task was not included in the JTHFT total score. When a subtest was not possible to be performed, it was scored with 60 seconds, as maximal score.

9HPT. The 9HPT is a brief, standardized, quantitative test of upper extremity function. The dominant and non-dominant hands are tested three times. The 9HPT was developed by Kellor and colleagues¹¹ with the purpose of measure the dexterity; it has a good inter-rater reliability.⁷ The 9HPT requires a small shallow

container holding nine pegs and a plastic block containing nine empty holes. On a start command when a stopwatch is started, the patient picks up the nine pegs one at a time as quickly as possible, puts them in the nine holes, and, once they are in the holes, removes them again as quickly as possible one at a time, replacing them into the shallow container.¹² The total time to complete the task is recorded. A trial with the dominant hand is immediately followed by a trial with the non-dominant hand. The complete procedure was repeated three times and the three times obtained were averaged to obtain the final 9HPT score. When the test was not possible to be performed, it was scored with 120 sec as maximal score.

For the JTHFT and 9HPT, subjects were seated in front of a table in a well-illuminated room and constant temperature. They were instructed to concentrate during the entire performance, to do it as quickly and accurately as possible, and not to talk unless required to.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize the scores. Mean and standard deviation were reported (mean \pm standard deviation). The relationships between the UEMS and the JTHFT and 9HPT were analyzed using the Pearson correlation test. The relationships between the clinical variables neurological level of lesion (a value from 1=C1 to 9=T1 was used for non-parametrical correlation) and the AIS (categorized from A to E) and the UEMS, and the functional variables (JTHFT and 9HPT) were analyzed using the Spearman's correlation test (Fig. 1).

Results

Mean UEMS was 25.3 ± 12.1 , mean JTHFT was 161.3 ± 120.4 sec and mean 9HPT was 80.96 ± 33.54 sec. As expected, 9HPT was significantly correlated to the JTHFT ($r=0.808$; $p=0.000$), and UEMS was significantly negatively correlated to both the JTHFT ($r=-0.658$; $p=0.000$) and the 9HPT ($r=-0.550$; $p=0.001$). AIS was significantly correlated to the JTHFT ($Rho=0.577$; $p=0.001$) and to the 9HPT ($Rho=0.396$; $p=0.034$). Moreover, AIS was significantly correlated to the UEMS ($Rho=0.601$; $p=0.001$). Lesion level was not correlated to the JTHFT ($Rho=-0.193$; $p=0.316$), and UEMS ($Rho=0.305$; $p=0.108$) and it showed a weak correlation with the 9HPT ($Rho=-0.369$; $p=0.049$).

Discussion

Our results suggest that both JTHFT and 9HPT can be similarly used to quantify the functional impairment after cervical SCI. Moreover, both functional tests reflect the global strengths of upper limbs; the higher the motor score, the faster the tests execution. Moreover, our data suggest that UEMS, JTHFT, and 9HPT strongly correlate with the AIS but not with the lesion level (Fig. 1).

Our data are partially in agreement with those from Thorsen and colleagues⁴ that reported that the lesion levels are not correlated with the functionality of the upper limb, and therefore suggest that the upper limb functionality has to be specifically addressed. On the other hand, our data differ from those of Thorsen and colleagues⁴ as we found a correlation between AIS and upper limb functionality. This difference could be due to the different hand function tests used in the two studies.

Theoretically, the cervical SCI may affect the hand functions in different ways, depending on the lesion level and the axial section damage.^{6,13-15} There is a direct relationship between the lesion level and the amount of affected myotomes. Moreover, hand function may depend on how much strength is preserved independently

◀F1

CERVICAL SCI HAND FUNCTIONS

3

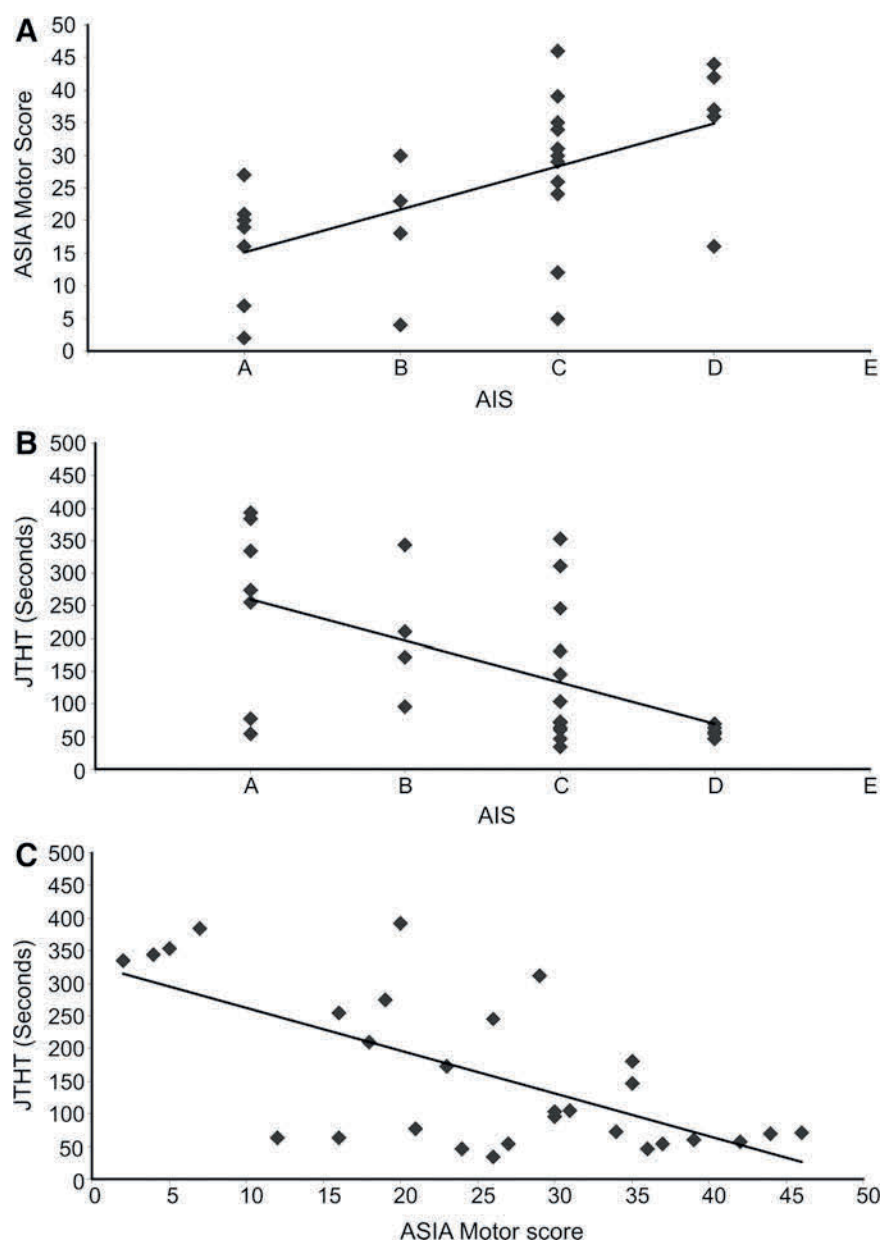


FIG. 1. (A) Correlation between American Spinal Injury Association (AISA) motor score as a measure of the muscle strength and ASIA impairment scale (AIS) as measure of the axial section damage. (B) Correlation between the Jebsen-Taylor Hand Function Test (JTHFT) as a measure of upper limb functionality and AIS. (C) Correlation between a functionality measure (JTHFH) and a muscle strength measure (ASIA Motor Score).

of the lesion level and on the damage on the axial section.^{6,13–15} The AIS provides a gross measure of the spinal cord damage in its axial section: The more extended is the axial section damage, the more severe is the clinical lesion. For example, a complete transection of the spinal cord produces (at least theoretically) a complete SCI lesion (AIS-A). It also presents a direct relationship between the axial section damage and the amount of affected corticospinal connections.^{6,13–15} We confirmed the relationship between the axial damage and the global strength with upper limb functions, whereas we failed to find a correlation between the lesion level and the upper limb function. Our findings can be of great importance for clinicians or researchers whose therapeutic interventions have as main objective to improve upper limb functionality in patients with cervical

SCI. We suggest that AIS, ASIA motor score, and functional tests (including JTHFT and/or 9HPT) could be used as outcome measures. Moreover, AIS and functional tests can provide valuable indirect information about the corticospinal function.^{13–15}

JTHFT and 9HPT repeatedly have been shown to be valid indicators of upper limb function in neurological and traumatic pathologies.^{7–9,12,16} Some other tests are appropriate for the measurement of hand function in SCI patients, for example the Graded Redefined Assessment of Strength, Sensibility and Prehension or the Capabilities of Upper Extremity Test, among others.^{5,17} However, we chose JTHFT and 9HPT because they can be completed in a short period of time. This aspect is important because in clinical trials, patients typically undergo a huge number of

clinical, neurophysiological and radiological evaluations. Sparing time will improve the quality of data collecting. Moreover, JTHFT and 9HPT measure one hand at a time, reducing possible bimanual interactions and compensations.

We would like to underline some limitations of our study: a) sensibility and proprioception were not measured; b) spasticity and pain were not taken into account; c) different drugs normally taken by the SCI patients can affect hand motor evaluation; and d) at least two mechanisms can cause the hand dysfunction (descending and ascending pathway damage and direct damage of spinal motoneurons and cervical roots). Even with these limitations, we consider our data to provide a picture of hand motor function of real SCI patients.

Moreover, these tests can provide accurate and reproducible information not only about the initial assessment of damage severity, but also about hand function evolution afterwards. Finally, because of the easy and fast application of these tests for both clinicians and patients, we would like to recommend their use in a more extended way in clinical practice, even in SCI patients. In order to evaluate the real benefit of these tests, more studies are required.

Author Disclosure Statement

No existing financial interests exist.

References

- Wyndaele, M. and Wyndaele, J.J. (2006). Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord* 44, 523–529.
- Snoek, G.J., IJzerman, M.J., Hermens, H.J., Maxwell, D., and Biering-Sorensen, F. (2004). Survey of the needs of patients with spinal cord injury: impact and priority for improvement in hand function in tetraplegics. *Spinal Cord* 42, 526–532.
- Kirshblum, S.C., Burns, S.P., Biering-Sorensen, F., Donovan, W., Graves, D.E., Jha, A., Johansen, M., Jones, L., Krassioukov, A., Mulcahey, M.J., Schmidt-Read, M., and Waring, W. (2011). International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *J. Spinal Cord Med.* 34, 535–546.
- Thorsen, R., Binda, L., Chiaramonte, S., Dalla Costa, D., Redaelli, T., Occhi, E., Beghi, E., and Ferrarin, M. (2014). Correlation among lesion level, muscle strength and hand function in cervical spinal cord injury. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 50, 31–38.
- Velstra, I.M., Bolliger, M., Tanadini, L.G., Baumberger, M., Abel, R., Rietman, J.S., and Curt, A. (2014). Prediction and stratification of upper limb function and self-care in acute cervical spinal cord injury with the graded redefined assessment of strength, sensibility, and prehension (GRASSP). *Neurorehabil. Neural Repair* 28, 632–642.
- Kalsi-Ryan, S., Beaton, D., Curt, A., Duff, S., Jiang, D., Popovic, M.R., Rudhe, C., Fehlings, M.G., and Verrier, M.C. (2014). Defining the role of sensation, strength, and prehension for upper limb function in cervical spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair* 28, 66–74.
- van Tuijl, J.H., Janssen-Potten, Y.J., and Seelen, H.A. (2002). Evaluation of upper extremity motor function tests in tetraplegics. *Spinal Cord* 40, 51–64.
- Jebsen, R.H., Taylor, N., Trieschmann, R.B., Trotter, M.J., and Howard, L.A. (1969). An objective and standardized test of hand function. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 50, 311–319.
- Hackel, M.E., Wolfe, G.A., Bang, S.M., and Canfield, J.S. (1992). Changes in hand function in the aging adult as determined by the Jebsen Test of Hand Function. *Phys. Ther.* 72, 373–377.
- Stern, L.M., Campbell, D.A., Hartley, E.W., and Homan, S.R. (1992). High cervical cord injury: medical, nursing and psychosocial aspects of rehabilitation. *J. Paediatr. Child Health* 28, 244–248.
- Kellor, M., Frost, J., Silberberg, N., Iversen, I., and Cummings, R. (1971). Hand strength and dexterity. *Am. J. Occup. Ther.* 25, 77–83.
- Oxford Grice, K., Vogel, K.A., Le, V., Mitchell, A., Muniz, S., and Vollmer, M.A. (2003). Adult norms for a commercially available Nine Hole Peg Test for finger dexterity. *Am. J. Occup. Ther.* 57, 570–573.
- Curt, A., Schwab, M.E., and Dietz, V. (2004). Providing the clinical basis for new interventional therapies: refined diagnosis and assessment of recovery after spinal cord injury. *Spinal Cord* 42, 1–6.
- Schwab, M.E. (2002). Repairing the injured spinal cord. *Science* 295, 1029–1031.
- Darian-Smith, I., Burman, K., and Darian-Smith, C. (1999) Parallel pathways mediating manual dexterity in the macaque. *Exp. Brain Res.* 128, 101–108.
- Lynch, K.B and Bridle, M.. (1989). Validity of the Jebsen-Taylor Hand Function Test in predicting activities of daily living. *Occup. Ther. J. Res.* 9, 316–318.
- Marino, R.J., Shea, J.A., and Stineman, M.G. (1998). The capabilities of upper extremity instrument: reliability and validity of a measure of functional limitation in tetraplegia. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 79, 1512–1521.

Address correspondence to:

Antonio Oliviero
Hospital Nacional de Paraplégicos
FENNSI Group
Finca La Peraleda s/n
45071, Toledo, Spain

E-mail: antonio@sescam.jccm.es

AUTHOR QUERY FOR NEU-2015-4155-VER9-CARRASCO_1P

AU1: The previous sentence was edited for clarity. Please verify that it states your intended meaning.

AU2: Did you mean JTHFT here instead of JHTH? Please define JHTH or else amend accordingly. Please make the corresponding corrections on the Figure 1 graphic, as well, if needed.

***"Static magnetic field stimulation over parietal cortex
enhances somatosensory perception in humans"***

**Carmen Carrasco-López¹, Vanesa Soto-León¹, Virginia Céspedes², Paolo Profice³, Bryan
A Strange^{4,5}, Guglielmo Foffani^{2,6*}, Antonio Oliviero^{1*}**

Abstract

The role of neuronal oscillations in human somatosensory perception is currently unclear. To address this, here we employ non-invasive brain stimulation to artificially modulate cortical network dynamics in the context of neurophysiological and behavioral recordings. We demonstrate that transcranial static magnetic stimulation (tSMS) over the somatosensory parietal cortex increases oscillatory power specifically in the alpha range, without significantly affecting bottom-up thalamo-cortical inputs indexed by the early cortical component of somatosensory evoked potentials. Critically, we next show that parietal tSMS enhances the perception of near-threshold somatosensory stimuli. Interestingly, this perceptual improvement reflects an absence of habituation to somatosensation observed in our sham tSMS control group. Our data therefore provide causal evidence that somatosensory perception depends on parietal alpha activity. Artificially increasing alpha power by placing a powerful magnetic field over the somatosensory cortex (tSMS) overcomes the natural decline in detection probability of a repeated near-threshold sensory stimulus.

Bajo revisión.

